

DIE WIRKUNG DES PHOTODYNAMISCHEN
EFFEKTS MIT THIOPYRONIN
AUF ENZYMATISCHE REAKTIONEN
IN VIVO UND IN VITRO

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Sumie Nishiyama-Watanabe

aus Tokio

1976

DIE WIRKUNG DES PHOTODYNAMISCHEN
EFFEKTS MIT THIOPYRONIN
AUF ENZYMATISCHE REAKTIONEN
IN VIVO UND IN VITRO

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Sumie Nishiyama-Watanabe

aus Tokio



Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 1976

1. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann
2. Referent: Priv. Doz. Dr. I. Lamprecht

Ich danke den Kollegen der Arbeitsgruppe Molekular-
biologie und des Hauses 5 des Zentralinstituts 5 für
anregende Diskussion und fürsorgliche Unterstützung.

Besonders Herr Prof. Dr. Ernst-Randolf Lochmann
und Frau Dr. Astrid Micheler haben mir sehr geholfen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. <u>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</u>	1
II. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	7
1. Material	7
2. Methoden	9
2.1 Bestrahlungen	9
2.2 Test auf Koloniebildungsfähigkeit	9
2.3 Messung der ADH-Aktivität	10
2.4 ADH-Extraktion aus Stamm 2200	10
2.5 Messung der Atmung der ganzen Zellen	11
2.6 Messung der anaerobischen Gärung der Zellen	11
2.7 Isolierung der Mitochondrienfraktion	12
2.8 Die Aktivitätsmessung der isolierten Mitochondrienfraktion	13
2.9 Reinigung von käuflicher tRNS	14
2.10 Extraktion der Aminoacyl-tRNS-Synthetase	14
2.11 Messung der Aminoacylierung	15
2.12 Messung der Proteinsynthese in einem zellfreien Polysomensystem	17
2.13 Messung der DNS-abhängigen RNS-Synthese	17
2.14 Bindungsversuche	18
III. <u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	19
1. TP-Wirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit der Hefezellen	19
1.1 Abhängigkeit der Dunkelwirkung von der TP-Konzentration	19
1.2 Abhängigkeit der photodynamischen Wirkung von der TP-Konzentration	20
1.3 Ploidiegradabhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung	22

2.	TP-Wirkung auf die Enzymaktivität von ADH	23
2.1	Dunkelwirkung auf ADH in vitro	23
2.2	Photodynamische Inaktivierung von ADH in vitro	24
2.3	Photodynamische Wirkung und Dunkelwirkung von TP auf ADH in unzerstörten Zellen	26
2.4	Bindung von TP an ADH	28
3.	TP-Wirkung auf die Atmungsaktivität von Hefezellen	29
3.1	Einwirkungszeitabhängigkeit der Dunkelwirkung	29
3.2	Bestrahlungszeitabhängigkeit des photodynamischen Effekts auf die Atmungsfähigkeit von Hefezellen	30
3.3	TP-Konzentrationsabhängigkeit der photodynamischen Wirkung auf die Atmung	32
4.	TP-Wirkung auf die Gärungs-Aktivität von Hefezellen	33
4.1	Einwirkungszeitabhängigkeit der Dunkelwirkung auf die anaerobische Gärung	33
4.2	Bestrahlungszeitabhängigkeit der photodynamischen Wirkung auf die anaerobische Gärung	34
4.3	Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von TP auf die anaerobische Gärung (Hell- und Dunkelwirkung)	35
5.	TP-Wirkung auf die isolierte Mitochondrienfraktion	36
6.	TP-Wirkung auf die Proteinsynthese in vitro	38
6.1	TP-Wirkung auf die Aminoacylierung der tRNS	39
6.1.1	Behandlung des gesamten Aminoacylierungssystem (außer D_L -Phe) mit TP ($22\mu M$) in Gegenwart und Abwesenheit vom Licht	40
6.1.2	Behandlung der Enzymfraktion mit TP im Dunkeln und Hellen	41
6.1.3	TP-Bindung an Aminoacyl-tRNS-Synthetase	43
6.1.4	Behandlung von tRNS mit TP mit und ohne Licht	44

6.1.5	TP-Bindung an tRNS	47
6.2	TP-Wirkung auf die durch endogenen Messenger gesteuerte Proteinbiosynthese in einem zellfreien System von Hefen (Stamm 211)	49
7.	TP-Wirkung auf die Transkription	51
7.1	Dunkelwirkung auf die RNS-Synthese in vitro	52
7.1.1	Behandlung des gesamten Systems	52
7.1.2	Behandlung von DNS gesondert	53
7.1.3	Behandlung des Enzyms gesondert	53
7.2	Hellwirkung von TP auf die RNS-Synthese in vitro	53

IV.	<u>ZUSAMMENFASSEND E DISKUSSION</u>	55
-----	-------------------------------------	----

	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	62
--	-----------------------------	----

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In der Regel wirkt sichtbares Licht auf biologische Systeme nicht inaktivierend und schädigend. Wenn jedoch ein photodynamisch aktiver Farbstoff in der Zelle vorhanden ist, kann die inaktivierende Wirkung des sichtbaren Lichts wirksam werden. Eine solche Wirkung des sichtbaren Lichts in Gegenwart eines Farbstoffs auf biologische Systeme nennt man photodynamischen Effekt oder photodynamische Erscheinung [Tappeiner und Jodlbauer, 1904, 1907]. Dieses Phänomen wurde bis zum Ende des 19. Jahrhunderts nur als Hautkrankheit des Haustiers oder als abnorme Empfindlichkeit der menschlichen Haut gegen Sonnenlicht beschrieben. Raab's Entdeckung [1900], daß Protozoen (*Paramecium*) unter Einwirkung von sichtbarem Licht in Gegenwart von Acriidin stärker abgetötet wurden als durch den Farbstoff im Dunkeln, stimulierte weitere Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung besonders von Tappeiner und seinem Mitarbeiter [vgl. Blum, 1941]. Seitdem wurden sehr viele Arbeiten mit verschiedenen Farbstoffen und verschiedenen Untersuchungsobjekten durchgeführt und veröffentlicht. Von den zusammenfassenden Übersichtsarbeiten seit 1907 seien hier erwähnt die Arbeiten von Tappeiner und Jodlbauer [1907], Blum [1941], Santamaria [1960], Bellin [1965], Spikes und Livingston [1969], Spikes und MacKnight [1970] und Lochmann und Micheler [1973].

In der Vergangenheit wurden viele Farbstoffe oft ohne Rücksicht auf ihre photodynamische Wirkung als Arzneimittel oder als Zusatz in Lebensmitteln und Kosmetika verwendet, damit wurden z.T. Haut- und Augenschäden induziert [vgl. Blum, 1941]. Außerdem könnte der photodynamische Effekt carcinogen wirken [Hämatoporphyrin oder Eosin: Büngler, 1937]. Im Gegensatz dazu ist die gezielte Anwendung des photodynamischen Effekts in der Therapie von Hautkrankheiten und Hauttumoren erprobt worden. Bereits 1905 wurde über Therapie von

Hauttumoren mit Farbstoff und Licht berichtet [Jesionek und Tappeiner 1905, zitiert aus Tappeiner und Jodlbauer 1907]. Die therapeutische Wirkung der Furocumarine bei Hautkrankheiten in Gegenwart von Licht ist schon vor ca. 3 000 Jahren bei den Ägyptern bekannt gewesen. Zur Zeit werden die Furocumarine in der klinischen Therapie vielfach angewendet. Auch der Farbstoff Thiopyronin und andere photodynamisch aktiven Farbstoffe werden auf ihre therapeutische Wirkung geprüft [vgl. Schäfer 1974].

Der Wirkungsmechanismus des photodynamischen Effekts in der Zelle ist unterschiedlich im Vergleich zu dem der ionisierenden Strahlen oder UV-Strahlen. Für die therapeutische Verwendung und für die methodische Anwendung in der Molekularbiologie ist die noch eingehendere Klärung seines Mechanismus notwendig.

Man kann den photodynamischen Effekt heute durch seinen molekularen Mechanismus in drei Gruppen einteilen, die Effekte I, II und III genannt werden [Lochmann und Micheler, 1973]. Beim Effekt I ist das Eindringen des Farbstoffs in die Zelle Voraussetzung. Der Farbstoff muß sich an Zellkomponenten anlagern, um dann die absorbierte Energie des sichtbaren Lichts auf die angelagerten Komponenten übertragen zu können. Diese Zellkomponenten werden dadurch verändert bzw. zerstört. Der Effekt I tritt nur in Gegenwart von O_2 auf. Er wurde früher mit "Innenwirkung" bezeichnet [Geißler, 1959; Metzner, 1924; Lochmann, Stein und Umlauf, 1965a, Lochmann und Stein, 1968]. Die meisten der bisher bekannten photodynamisch aktiven Farbstoffe wirken nach Effekt I. Der physiko-chemische Mechanismus von Effekt I ist recht gut bekannt [Foote, 1968]. Allerdings ist er sehr abhängig von der Farbstoffart [Kornhauser et al., 1973; Gennari et al., 1974; Kellmann, 1974; Saito et al., 1975; van de Vorst und Lion, 1975].

Der Effekt II ist auch sauerstoffabhängig, jedoch ist bei dieser Wirkung eine vorherige Bindung an Zellkomponenten nicht unbedingt Voraus-

setzung. Eosin wirkt teilweise nach Effekt II [Lochmann und Stein, 1968]. Dieser Effekt wurde früher mit "Außenwirkung" im Gegensatz zur "Innenwirkung" bezeichnet. Der Effekt III ist sauerstoffunabhängig. Die Furocumarine (z.B. Psoralen, Bergapten) sind bekannt als Farbstoffe, die nach diesem Effekt wirken. Nach Blum [1941] und Spikes [1968] sollte der Terminus "photodynamischer Effekt" nur für farbstoffsensibilisierte Photooxidationen gelten; nach einer solchen Definition wäre der Effekt III kein photodynamischer Effekt. Es wurde nachgewiesen, daß Thiopyronin (TP) nach Effekt I wirkt [Lochmann und Stein, 1968] und daß TP bei Hefezellen im Vergleich mit anderen Farbstoffen den stärksten photodynamischen Effekt auslöst [Lochmann, Stein und Umlauf, 1965]. Auch bei Bakterien erwies sich TP als der bisher photodynamisch aktivste Farbstoff [vgl. z.B. Wacker, Türk und Gerstenberger, 1963].

Die molekulare Wirksamkeit des photodynamischen Effekts auf Pro- und Eukaryontenzellen ist unterschiedlich. So ist bei Hefen die Mutationsauslösung nach photodynamischer Behandlung nicht oder nur sehr gering vorhanden [Lochmann, Stein und Haefner, 1964; Marquard und Laer, 1966]. Bei Bakterien können Mutationen nachgewiesen werden [Kaplan, 1948, 1950; Böhme und Wacker, 1963; Nakai und Saeki, 1964; Ritchie, 1965] und bei Phagen tritt die höchste Mutationsrate auf [Brendel und Kaplan, 1967; Brendel, 1968; Calberg-Bacq et al., 1968].

Eine Ploidiegradabhängigkeit der photodynamischen Inaktivierungsrate tritt bei verschiedenen Hefestämmen (n , $2n$, $4n$ und $6n$) nicht oder sehr gering auf [Lochmann, Stein und Haefner, 1964]. Bei Hefen fehlt die Reaktivierbarkeit des photodynamischen Schadens [Ito und Hieda, 1968; Lochmann und Stein, 1968]. Bei Bakterien sind die photodynamischen Schäden z.T. reaktivierbar bzw. reparabel. So zeigt z.B. *E. coli* Stamm B/r Reaktivierbarkeit, die aber bei B_{s-1} fehlt [Das et al., 1974; Geißler, 1967, 68, 70a, b, c, d].

Solche Ergebnisse und die sofortige Blockierung der RNS- und Proteinsynthese in vivo bei Hefezellen nach photodynamischer Behandlung der Zellen im Gegensatz zu den andersartigen Verhalten nach Röntgenbestrahlung [Micheler, Pietsch und Lochmann, 1973] deuten daraufhin, daß das genetische Material in vivo bei Eukaryonten nicht durch photodynamische Behandlung geschädigt wird, sondern daß hauptsächlich die Funktion plasmatischer Strukturen blockiert wird und dadurch die Zellen inaktiviert werden. Bei Prokaryonten dagegen wird offensichtlich die DNS wesentlich stärker durch den photodynamischen Effekt geschädigt. Hier führt hauptsächlich der genetische Schaden zum Zelltod. Der Grund für die relative Unempfindlichkeit des genetischen Materials in Eukaryonten gegen den photodynamischen Effekt kann man eventuell in der Tatsache suchen, daß es den kationischen Farbstoffmolekülen nicht gelingt, die vielen Barrieren bis zur Erreichung der DNS in den Chromosomen zu überwinden. Sie werden vorher bereits an viele Strukturen - vor allem im Cytoplasma - gebunden. Hier sind es besonders Membranstrukturen und Ribosomen, die größere Mengen an Farbstoff binden [Micheler, 1972]. Selbst bei Anwendung höherer TP-Konzentrationen gelang es bisher nicht, TP am Chromatin der Eukaryontenzelle nachzuweisen [Lochmann und Micheler, persönliche Mitteilung].

Da jedoch die Abtötung durch TP im Dunkeln bei sehr hoher Farbstoffkonzentration (außen 1 mg/ml und höher) Ploidiegradabhängigkeit bei homozygoten, isogenen Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades zeigt [Lochmann, Stein und Haefner, 1964], kann vermutet werden, daß bei diesen sehr hohen Außenkonzentrationen auch Bindungen des Farbstoffs an der DNS möglich werden. Die Wirkung des photodynamischen Effekts mit TP wird dagegen mit Konzentrationen von 5-100 $\mu\text{g/ml}$ (11-220 μM) untersucht. Wenn nun dieser photodynamische Effekt in

Eukaryonten hauptsächlich durch nicht-genetische Schäden zur Inaktivierung führt, so ist die Untersuchung der Frage wichtig, welche plasmatischen Strukturen besonders zerstört werden und welche Inaktivierungen hauptsächlich zur Letalität führen.

Im Vordergrund solcher Untersuchungen stehen besonders die Experimente, die die Wirkung auf Enzyme oder Enzymsysteme beobachten. Da enzymatische Prozesse an vielen Stellen der Zelle ablaufen, ist die Untersuchung darüber, ob verschiedene Enzymreaktionen unterschiedlich inaktiviert werden, besonders interessant.

Die Wirkungen anderer Farbstoffe auf Enzymreaktionen [vgl. zusammenfassende Darstellung in Spikes und Glad, 1964; Spikes und Livingston, 1969; Spikes und MacKnight, 1970] wurde verschiedentlich, besonders von Spikes und Mitarbeitern untersucht. Mit TP dagegen liegen nur wenige Untersuchungen auf die Enzymreaktionen bei der Proteinsynthese und beim Stofftransport durch die Membran vor [Micheler, 1972; Micheler und Lochmann, 1973].

Meine Aufgabe ist es nun, verschiedene in der Hefezelle ablaufende wichtige enzymatische Reaktionen herauszugreifen und die Enzyme und z.T. auch andere Komponenten der Reaktion auf ihre photodynamische Empfindlichkeit zu untersuchen. Einige Reaktionen wurden sowohl unter in vitro als auch unter in vivo Bedingungen geprüft. Weiterhin wurde auch die Dunkelwirkung des Farbstoffs konzentrationsabhängig geprüft. Die Experimente begannen mit der Beobachtung der photodynamischen Wirkung auf die Alkoholdehydrogenase (ADH) in vitro und in vivo und setzten sich fort in komplexeren Enzymreaktionen, z.B. durch Untersuchung auf die Aktivität der Mitochondrien sowie die Atmungs- und Gärungsfähigkeit der ganzen Hefezelle. Weiterhin wurden die Enzymreaktionen bei der Transkription und Translation der

Hefezellen in zellfreien Systemen geprüft und die Bindungsfähigkeit des Farbstoffs an verschiedene Enzyme mit spektrophotometrischer Methode gemessen. Die gefundenen Ergebnisse wurden mit den in der Literatur veröffentlichten Werten verglichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Saccharomyces-Stämme: Die Stämme 211 (haploid), 415 und 2200 (tetraploid) sind weitgehend isogen und homozygot. Ihre Eigenschaften und Kultivierungsbedingungen sind früher beschrieben worden [Laskowski, 1962; Reichert, 1969].

Thiopyronin (TP): TP wurde von der Firma Merck (Darmstadt) als ZnCl_2 -Doppelsalz bezogen.

Desoxyribonukleinsäure (DNS): hoch polymere reine Kalbthymus DNS

Transferribonukleinsäure (tRNS): unspezifische Hefe-tRNS (Firma Sigma).

Für die Aminoacylierungsversuche wurde tRNS mit einer Sephadex-säule (G 100) gereinigt und nach Dialysierung gegen H_2O bei -20°C gelagert.

Alkoholdehydrogenase (ADH): für analytische Zwecke Lyophilisat aus Hefe (Firma Boehringer Mannheim). Für die Versuche wurde ADH in einer Konzentration von 25 mg/ml in 0.1% Albuminlösung oder in bidestilliertem Wasser gelöst.

Albumin aus Rinderserum: für die Stabilisierung der Enzyme (Firma Serva, Heidelberg), für die Aktivitätsmessung der isolierten Mitochondrien: Fraktion V Puder (Firma Sigma), 20%ige Lösung wurde über Nacht gegen 0.01 M Tris- SO_4 dialysiert, dann bei -20°C gelagert.

Hexokinase aus Hefe (Firma Sigma), Typ III: für die Versuche wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0.1 M Glucose-Lösung gelöst und bei -20°C gelagert.

GSH (Glutathion, reduzierte Form): Boehringer Mannheim

NAD (β -Nicotinamid-adenin dinukleotid, oxidierte Form): Boehringer Mannheim, Reinheitsgrad I.

Nährmedien:

Vollmedium (VM): 1% Difco Yeast Extract, 0.5% Pepton, 2% Glucose, für Platten zusätzlich 2% Agar.

YEP-Medium: 1% Difco Yeast Extract, 2% Pepton, 3% Äthanol (v/v).

Lösungen für die Isolierung der Mitochondrien:

MTE: 0.25 M Mannitol, 0.02 M Tris-SO₄, 10⁻³ M EDTA, pH 8,0 und 7.4

STE: 0.25 M Sorbitol statt Mannitol.

Lösung für die Reinigung von tRNS: 1 M NaCl einschließlich 0.05% NaN₃

Säule für die Reinigung von tRNS: Sephadex G 100, Ø 3 cm, 150 cm lang

Lösungen für die Isolierung der Aminoacyl-tRNS-Synthetase:

Extraktionspuffer: 100 mM Tris-Cl pH 7.8, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 6 mM Mercaptoäthanol, 0.1 mM EDTA, 10% Glycerin.

Protaminsulfat 1%ige Lösung, pH 7.5

Dialysenpuffer: 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 6 mM Mercaptoäthanol, 10% Glycerin.

Radioaktive Substanzen: ¹⁴C-L-Lysin (283 µCi/µM), ¹⁴C-^D_L-Phe (193 µCi/µM), ³H-UTP (22 µCi/mM), ¹⁴C-Aminosäuregemisch (durchschnittlich ca. 100 µCi/µM) [Firma NEN Chemicals].

Scintillationsflüssigkeit: 4g/l Omnifluor in Toluol.

2. Methoden

2.1 Bestrahlungen:

Die Proben wurden mit einer Osram Glühlampe 200 W bei 0°C (im Eisbad) oder bei Zimmertemperatur (20°C) unter magnetischem Rühren im Abstand von 30 cm bestrahlt. Spektrale Lichtintensität ist $3,67 \cdot 10^5 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$ [siehe Wels, G., 1941].

2.2 Test auf Koloniebildungsfähigkeit:

Es wurde mit stationären Zellen (48 Std. -Kultur) gearbeitet, die in VM unter Schütteln bei 30°C kultiviert worden waren. Nach dreimaligem Waschen mit $0,05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ wurden die Zellen fraktioniert zentrifugiert, um Zellklumpen zu beseitigen, und der Zelltiter so eingestellt, daß der Endtiter 5×10^5 Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension wurde mit TP-Lösung in $0,05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ verschiedener Konzentration entsprechend den Versuchsbedingungen verschieden lange inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und im gleichen Volumen ($0,05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$) wie vor Abzentrifugation resuspendiert. Bei Hellinaktivierung wurden die Proben dann in kleinen Petrischalen ($\varnothing$ 3 cm) bei geringer Schichtdicke der Lösung (2 mm) mit sichtbarem Licht bestrahlt. Nach bestimmten Zeiten wurden 0,1 ml-Proben entnommen, in geeigneter Weise mit $0,05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ verdünnt und 0,1 ml der Suspension auf VM-Agar-Platten ausgestrichen. Nach 3tägiger Bebrütung der Platten bei 30°C wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt und mit Kontrollplatten verglichen.

2.3 Messung der ADH-Aktivität:

Zusammensetzung der Testlösung: 85.5 mM Natriumpyrophosphat, 19.1 mM Glycin, 6.2 mM Semicarbazid-hydrochlorid, 0.6 mM Äthanol, 2.0 mM NAD, 1.0 mM GSH.

0.9 ml frisch zusammengesetzte Testlösung wurde im Spektrophotometer (Beckman DB-GT) mit Recorder bei 20°C eingesetzt. Nach Einschalten des Recorders wurden 5 µl oder 10 µl der Probe (je nach ihrer Aktivität zugesetzt), gut eingemischt und bei 340 nm mit der Zeit gemessen. Durch die Geschwindigkeitsänderung der Zunahme der Extinktion von NADH nach der Behandlung durch TP oder/und Licht wurde die Aktivitätsänderung berechnet. Die Enzymkonzentration der Probe wurde so gewählt, daß die initiale Geschwindigkeit der Reaktion proportional zur Enzymkonzentration bleibt.

2.4 ADH-Extraktion aus Stamm 2200:

Ca. 10^{10} mit 0.05 M KH_2PO_4 gewaschene stationäre Zellen wurden in 10 ml 0.05 M KH_2PO_4 suspendiert und mit Glasperlen (ϕ 0.45 mm) im Braun-Homogenisator 1 min. homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert und die Glasperlen mit 5 ml 0.05 M KH_2PO_4 nachgespült. Das filtrierte Homogenat wurde mit Spülpuffer bei 2°C bei 16 000 Upm für 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde RE_I genannt. Der Niederschlag besteht aus unzerstörten Zellen, groben Zelltrümmern, Mitochondrien u. a. Der RE_I -Überstand wurde bei 2°C mit 60 000 Upm ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde RE_II genannt. Der Niederschlag besteht im wesentlichen aus Polysomen, Ribosomen und feinen Zelltrümmern.

2.5 Messung der Atmung der ganzen Zellen:

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit einem Warburg-Apparat (Braun Melsungen, Typ SL 85) gemessen. Ca. 2×10^8 Zellen (Stamm 211) in 1 ml Puffer (0.05 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6.8 oder 0.05 M KH_2PO_4 , pH 4.5) wurden in den Hauptraum der Reaktionsgefäße (15 ml), 0.2 ml 12%ige Glucoselösung in die Seitenbirnen und 0.3 ml 20%ige Kaliumhydroxidlösung in den Absorptionseinsatz pipettiert. Die harmonika-artig gefalteten Filterpapierchen wurden mit einer Pinzette in die Absorptionseinsätze eingelegt, um die absorbierenden Oberflächen zu vergrößern. 15 Minuten nach Einsetzen der Gefäße ins Wasserbad (30°C) wurden die Gefäße geschlossen, dann wurde die Glucoselösung aus der Seitenbirne in den Hauptraum gekippt und mit der Messung begonnen. Die Gefäße wurden im Wasserbad mit einer Amplitude von 2 cm mit einer Geschwindigkeit von 100 Ausschlägen/min. geschüttelt, um die ständige Sättigung des Mediums mit Sauerstoff zu gewährleisten. Die Druckänderung durch den Sauerstoffverbrauch der Zellsuspension wurde in 10 min. Abständen über einen Zeitraum von 60 min. am Manometer abgelesen. Als Manometerflüssigkeit wurde Brodielösung verwendet. Um die Schwankung der Temperatur des Wasserbads im Verlauf eines Versuchs auszuschalten, wurde ein Gefäß ohne Zellen als Thermobarometer benutzt.

2.6 Messung der anaerobischen Gärung der Zellen:

Um die Messung der Gärung zu vereinfachen, wurden die Bedingungen anaerobisch gemacht und bei einem pH-Wert unter 5 die Messung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wird Kohlendioxid als einziges Gas im Verlauf der alkoholischen Gärung gebildet und die Menge des gebildeten Kohlendioxids ist dann durch das Produkt der festge-

stellten Druckänderung mit der Gefäßkonstanten für CO_2 gegeben. Ca. 7×10^7 Zellen (Stamm 211) in 1 ml 0.05 M KH_2PO_4 bei pH 4.5 wurden in den Hauptraum der Gefäße und 0.2 ml von 20%iger Glucoselösung wurden in diese Seitenbirnen pipettiert. Nach Einsetzen der Gefäße ins Wasserbad (30°C) wurde die Luft in der manometrischen Apparatur gegen Stickstoffgas durch 15 min. langes Spülen ausgetauscht. Dann wurde die Glucoselösung in den Hauptraum gekippt und mit der Messung begonnen. Die weiteren Bedingungen sind die gleichen wie bei der Messung der Atmung.

2.7 Isolierung der Mitochondrienfraktion:

Stationäre Zellen (Stamm 211) aus einer 5 l-VM-Kultur wurden mit bidestilliertem Wasser 2 mal gewaschen, resuspendiert in 500 ml YPE-Medium und unter starkem Rühren bei 30°C für 2 Stunden kultiviert, um die Atmungsfähigkeit der Mitochondrien zu erhöhen [Mattoon und Balcavage, 1967]. Die Zellen wurden abzentrifugiert, 2 mal gewaschen mit bidestilliertem Wasser, und einmal gespült mit MTE oder STE, pH 8, anschließend suspendiert in 20% Glycerin in MTE oder STE pH 8, Endvolumen 120 ml und in French-Press-Zellen eingefroren. Die gefrorene Zelle wurde nach 10 Stunden ausgepreßt bei 600 kg/cm^2 . Der pH-Wert des Homogenats wurde mit ca. 100 ml MTE oder STE pH 8 bis zu 6.8 eingestellt. Dann wurde das Homogenat bei 2 600 Upm für 10 min. rezentrifugiert. Der Überstand wurde mit vorherigem Überstand bei 12 000 Upm (10 000 g) in einer Sorvallzentrifuge für 20 min. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde suspendiert in MTE oder STE pH 7.4, und bei 3 500 Upm (1 400 g) für 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter bei 10 000 g und 1 400 g 3 mal wiederholt zentrifugiert. Der Niederschlag

der letzten Zentrifugation wurde suspendiert in 0.5 ml MTE oder STE, pH 7.4 einschließlich 0.1% Albumin und als Mitochondrienfraktion für die Aktivitätsmessung benutzt.

2.8 Die Aktivitätsmessung der isolierten Mitochondrienfraktion:

Der Sauerstoffverbrauch der isolierten Mitochondrienfraktion wurde mithilfe des gleichen Warburgapparates wie bei Verwendung ganzer Zellen gemessen, wobei Succinat, Malat, Pyruvat oder Äthanol als Substrat zugegeben wurde. Die Mitochondrienfraktion zeigte die höchste Aktivität, wenn Succinat als Substrat zugegeben wurde. Deswegen wurden Versuche zur Wirkung von TP auf die Mitochondrienfraktion nur mit Succinat durchgeführt.

Das Reaktionsgemisch im Hauptraum (1550 μ l) bestand aus 30 μ M Kaliumphosphat, 80 μ M Tris-SO₄ pH 7.4, 3.2 μ M EDTA, 10 mg Albumin aus Rinderserum, 25 μ M MgCl₂, 2 μ M ADP, ca. 1 mg Protein in der Mitochondrienfraktion [nach Lowry Methode].

0.5 mg Hexokinase, 40 μ M Succinat und 100 μ M Glucose in 250 μ l wurden in die Seitenbirne gegeben. Das Absorptionsmittel (5 M KOH, 200 μ l) wurde in den Absorptionseinsatz eingefüllt und harmonikaartig gefaltete Filterpapierchen eingelegt. Der pH-Wert des Reaktionsgemischs war ca. 6.7. Das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad gemacht und 5-10 min. nach Einsetzen der Gefäße ins Wasserbad (30°C) wurde der Nullpunkt abgelesen und Substrat, Glucose und Hexokinase wurden von den Seitenbirnen in den Hauptraum gekippt, anschließend wurde mit der Messung begonnen. Die Druckänderung wurde in 5 min. Abständen über einen Zeitraum von 20 min. abgelesen.

2.9 Reinigung von käuflicher tRNS:

100 mg tRNS wurde durch eine Sephadexsäule G 100 ($\emptyset$ 3 cm, 150 cm) mit 1 M NaCl einschließlich 0.05 % NaN_3 fraktioniert. Aktive Fraktionen wurden nach der OD_{260} jeder Fraktion gepoolt und mit 2 Volumen kaltem Äthanol wurde die fraktionierte tRNS niedergeschlagen. Der Niederschlag wurde in kleinen Mengen bidestilliertem Wasser gelöst und gegen die 1 000fache Menge bidestilliertes Wasser dialysiert, um Na^+ wegzunehmen. Nach der Dialyse wurde in 1 ml-Fractionen bei 20°C gelagert [siehe Lothar, 1975].

2.10 Extraktion der Aminoacyl-tRNS-Synthetase:

30 g Feuchtheife wurde mit Extraktionspuffer gewaschen und mit Glasperlen im Braun-Homogenisator 45 sec. homogenisiert. Das Homogenat mit Glasperlen wurde bei 2°C bei 4 500 Upm für 15 min. zentrifugiert. Der pH-Wert wurde mit 1 M Tris auf 7.5 nachgestellt. Der Überstand wurde bei 12000 Upm für 20 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 40 000 Upm für 2.5 Std. weiter ultrazentrifugiert. Dem Überstand wurde 20% Volumen 1%iger Protaminsulfatlösung zugegeben und bei 0°C eine halbe Std. stehengelassen. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 19 000 Upm für 20 min. abzentrifugiert. Der Niederschlag bei 30 bis 70%ige Ammoniumsulfat-Sättigung im Überstand wurde in kleinen Mengen Dialysepuffer gelöst. Nach der Dialyse gegen die 1 000fache Puffer-Menge wurde der Glyceringehalt der Enzymlösung auf 50% erhöht und bei -20°C gelagert [siehe Lothar, 1975].

2.11 Messung der Aminoacylierung:

Die Testlösung setzte sich aus 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM ATP (vorher mit KOH neutralisiert), 0.05 μCi ^{14}C -Aminosäure und unterschiedliche mM MgCl_2 zusammen. Die Menge von tRNS und Enzymfraktion wurde bei den Tests zur Konzentrationsabhängigkeit so gewählt, daß eine etwas geringere Menge als die optimale Menge vorhanden ist (ca. 140 μg tRNS und 4 μl Enzymlösung, Abb. 1 und 2). Die bei 0°C angesetzte Testlösung wurde im Wasserbad bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Inkubationszeit wurde durch eine Kinetikkurve (Abb. 3) bis zu 20 min. bestimmt.

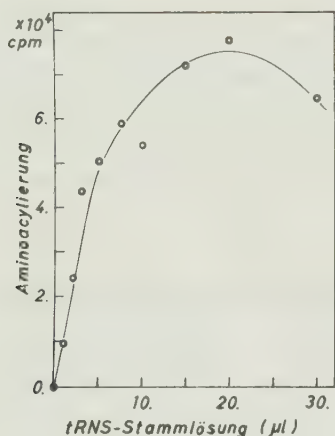


Abb. 1:

tRNS-Konzentrationsabhängigkeit der Aminoacylierung (Lys).

(tRNS-Stammlösung 28.5 mg/ml, Enzymlösung 5 μl , Inkubation 20 min.

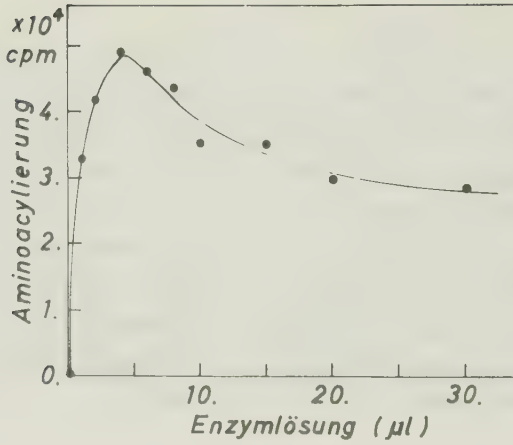


Abb. 2:

Enzymkonzentrationsabhängigkeit der Aminoacylierung (Lys).
(tRNS-Stammlösung 5 µl, Inkubation 20 min.).

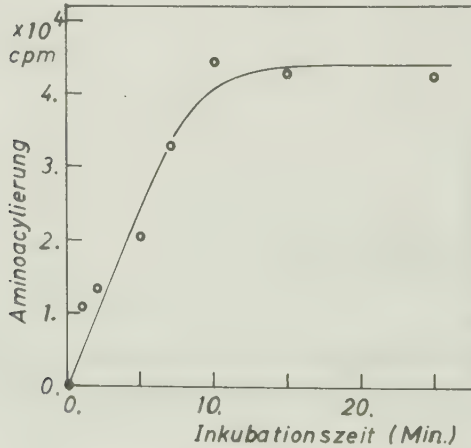


Abb. 3 :

Inkubationszeitabhängigkeit der Aminoacylierung (Lys).
(Enzymlösung 4 µl, tRNS-Stammlösung 5 µl).

Die Reaktion wurde bei 0°C durch Zugabe von 1 ml eiskalter 5%iger TCA-Lösung (Trichloressigsäure) beendet. Der Niederschlag wurde über Glasfaserfilter (Schleicher und Schüll, Typ GF 92, Ø 25 mm) filtriert und mit ca. 5 ml eiskalter 5%iger TCA-Lösung nachgespült, dann wurde mit ca. 2,5 ml Äthanol und schließlich mit Äthanol/Äther 1:1 gewaschen. Getrocknet wurde bei 70°C. Die Radioaktivität des Filters wurde mit dem Scintillationszähler (Beckman LS-233) gemessen [siehe Lothar, 1975].

2.12 Messung der Proteinsynthese in einem zellfreien Polysomensystem:

Die Isolierung der verwendeten Polysomen und des Überstands-enzymys aus Hefezellen (Stamm 211) und die Durchführung des Tests zur zellfreien Proteinsynthese erfolgten nach einer von Schulz-Harder beschriebenen Methode [Schulz-Harder, 1975].

2.13 Messung der DNS-abhängigen RNS-Synthese:

Die Isolierung und Reinigung der verwendeten RNS-Polymerase B aus Hefezellen (Stamm 211) und die Durchführung des Tests zur zellfreien RNS-Synthese sind bereits an anderer Stelle beschrieben worden [Micheler, Pietsch, Nishiyama-Watanabe, 1975].

Die Testlösung bestand aus 150 µM GTP, 150 µM CTP, 150 µM ATP, 10 µM UTP, 1.7 mM MnCl₂, 80 µg/ml denaturierter Kalbthymus-DNS, 0.13 µg/ml ³H-UTP, 2 mM MgCl₂, 33 mM (NH₄)₂SO₄ und 0.05 mg Protein/ml RNS-Polymerase B-Fraktion.

2.14 Bindungsversuche:

Die spektralphotometrischen Untersuchungen erfolgten nach einer von Micheler beschriebenen Methode [Micheler, 1972].

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. TP-Wirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit der Hefezellen

1.1 Abhängigkeit der Dunkelwirkung von der TP-Konzentration:

Die Proben mit bekannter Zellkonzentration (Endtiter ca. 5×10^5 /ml) werden in TP-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen für 5 min. bzw. 60 min. im Dunkeln inkubiert, anschließend abzentrifugiert, resuspendiert in 0.05 M KH_2PO_4 , verdünnt mit 0.05 M KH_2PO_4 in die gewünschte Zellkonzentration, dann auf Nähragar ausgespatelt und bei 30°C kultiviert. Nach 2-3 Tagen werden die aufgewachsenen makroskopisch sichtbaren Kolonien gezählt und die Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Proben ermittelt.

Abb. 4 zeigt, daß die Dunkelinaktivierung bei dem tetraploiden Stamm 2200 mit steigender TP-Konzentration bis zu 1 mg/ml (2.2 mM) und mit zunehmender Einwirkungszeit zunimmt. Dieser Verlauf ist genauso wie bei einem diploiden Stamm [vgl. auch Lochmann, 1967; Micheler und Lochmann, 1974]. Diese Dunkelwirkung muß bei den Untersuchungen zum photodynamischen Effekt berücksichtigt werden. Sie ist allerdings bei der Konzentration, die in der Regel für photodynamische Inaktivierung benutzt wurde (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 22 μM) sehr gering.

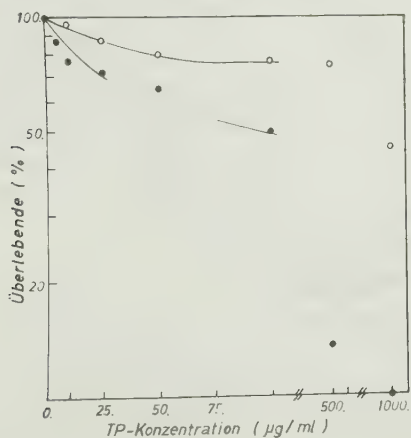


Abb. 4:
Inaktivierung der Koloniebildungsfähigkeit von tetraploiden *Saccharomyces*-zellen (Stamm 2200) durch unterschiedliche TP-Konzentrationen im Dunkeln nach 5 min (o) und nach 60 min. (•) Einwirkzeit.

1.2

Abhängigkeit der photodynamischen Wirkung von der TP-Konzentration:

Nach der Vorinkubation in TP-Lösung wurden die Zellproben gewaschen, die Zellen dann in 0.05 M KH_2PO_4 resuspendiert und mit sichtbarem Licht im Abstand von 30 cm unter Rühren bei 22°C verschiedene Zeitintervalle bestrahlt. Die photodynamische Inaktivierungsrate wird jeweils auf die Dunkelinktivierungsrate bei derselben TP-Konzentration, die gleich 100 % gesetzt wird, bezogen. Die Abb. 5 und 6 zeigen, daß die photodynamische Inaktivierung bei Stamm 2200 mit steigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (110 μM) bei 60 min. Vorinkubation, bei 5 min. Vorinkubation bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (220 μM) zu- und bei weiterer Steigerung wieder abnimmt. Die Konzentration, bei der maximale Inaktivierung eintritt, ist also abhängig von der Vorinkubationszeit (Abb. 5 und 6). In Abb. 7 sind nochmals die Dosiseffektkurven bei 5 min. und 60 min. Vorinkubationszeit wiedergegeben.

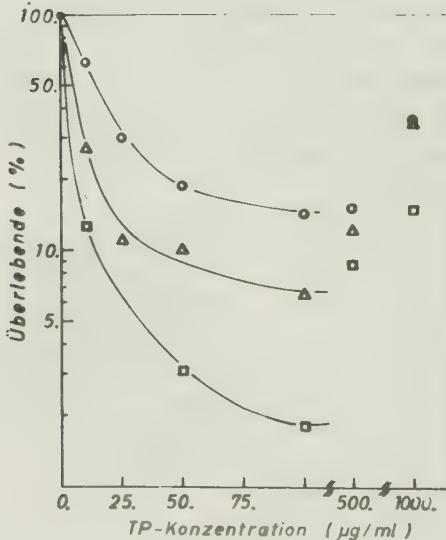


Abb. 5:

Abhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung der Koloniebildungsfähigkeit eines tetraploiden *Saccharomyces*-stammes (2200) von der TP-Konzentration und der Bestrahlungszeit bei 5 min. Vorinkubationszeit im Dunkeln (Bestrahlungszeit 1 min. $\circ$ — $\circ$, 5 min. Δ — Δ , 10 min. $\square$ — $\square$).

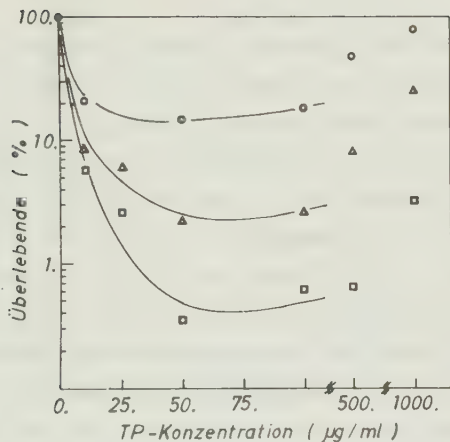


Abb. 6:

Abhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung der Koloniebildungsfähigkeit eines tetraploiden *Saccharomyces*stammes (2200) von der TP-Konzentration und der Bestrahlungszeit bei 60 min. Vorinkubation im Dunkeln (Bestrahlungszeit 1 min. o—o, 5 min. Δ—Δ, 10 min. □—□).

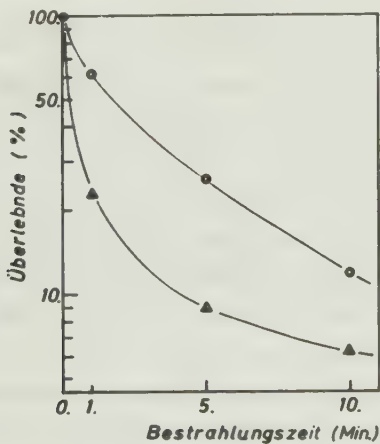


Abb. 7:

Dosiseffektkurven der photodynamischen Inaktivierung mit TP beim tetraploiden *Saccharomyces*stamm 2200 bei 5 (o—o) bzw. 60 min. (Δ—Δ) Vorinkubation in Farbstofflösung.

Bei konstanter Konzentration an TP haben die Zellen nach 60 min. Vorinkubationszeit mehr Farbstoff aufgenommen als nach 5 min. Vorinkubationszeit [Micheler und Lochmann, 1974], so daß nach 60 min. der Schutzeffekt des überschüssigen, nicht gebundenen TPs bereits bei niedrigerer Konzentration eintritt, als nach 5 min. Vorinkubationszeit. In beiden Fällen nimmt die Inaktivierungsrate erst mit steigender Konzentration zu und fällt nach Überschreiten einer für die Inaktivierung optimalen Konzentration wieder ab. Allerdings sind die Konzentrationen, bei denen maximale Inaktivierung eintritt bei verschiedenen Stämmen etwas unterschiedlich. Der hier verwendete tetraploide Stamm nimmt TP mehr als ein diploider Stamm auf und es dauert länger bis die maximale Aufnahme erreicht ist als beim diploiden Stamm. Aber 60 min. Vorinkubationszeit genügen für beide Stämme, um mit TP gesättigt zu werden. Bei 5 min. Vorinkubationszeit ist das aufgenommene TP noch abhängig von der TP-Konzentration der Außenlösung.

1.3 Ploidiegradabhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung:

Stationäre Zellen von jedem Stamm (211, 415, 2200) wurden 20 min. in TP-Lösung (22 μ M) im Dunkeln inkubiert und verschiedene Zeitintervalle bestrahlt. Die photodynamische Inaktivierungsrate wird auch hier jeweils auf die Dunkelinaktivierungsrate bezogen.

In Abb. 8 erkennt man keine Ploidiegradabhängigkeit der photodynamischen Inaktivierung: bei konstanter Vorinkubationszeit ist die Überlebensrate bei den 2 verwendeten Ploidiegraden gleich. Diese Ergebnisse bestätigen die von Lochmann, Stein und Haefner [1964] erhaltenen Ergebnisse bei der photodynamischen Inaktivierung von homozygoten, isogenen, haploiden bis hexaploiden Hefestämmen mit Thiopyronin und Licht.

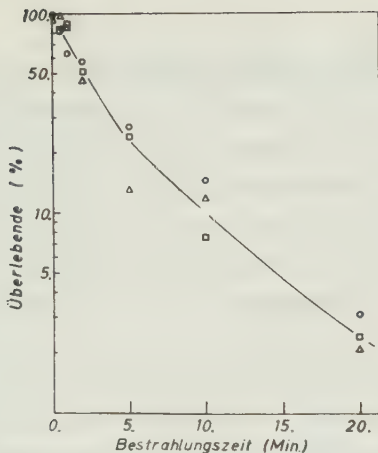


Abb. 8:

Dosis-effektkurven der photodynamischen Inaktivierung mit TP von 3 verschiedenen Saccharomycesstämmen [TP-Konzentration $22 \mu\text{M}$, o—o Stamm 211 (2n); Δ — Δ Stamm 2200 (4n); $\square$ — $\square$ Stamm 415 (4n)].

2. TP-Wirkung auf die Enzymaktivität von ADH

2.1 Dunkelwirkung auf ADH in vitro:

ADH in der Fraktion RE_I , in RE_{II} und in der Lösung von käuflichem ADH-Lyophilisat aus Hefe (siehe Methode) wurde mit TP in verschiedener Konzentration (0 – $220 \mu\text{M}$) im Dunkeln für 20 min. bei 3 verschiedenen Temperaturen 0°C , 20°C und 30°C inkubiert. Anschließend wurde die ADH-Aktivität photometrisch bei 20°C gemessen. Es wurde keine Inaktivierung der Enzymaktivität beobachtet.

2.2 Photodynamische Inaktivierung von ADH in vitro:

Um den photodynamischen Effekt zu testen, wurden die im Dunkeln mit TP behandelten Proben zusätzlich mit sichtbarem Licht im Abstand von 30 cm unter Rühren bei 0°C bzw. 20°C verschiedene Zeitintervalle bestrahlt. Dann wurde die ADH-Aktivität wie bei der Dunkelbehandlung gemessen. Als Kontrolle wurde ADH ohne Zugabe von TP mit sichtbarem Licht bestrahlt. Es trat ohne TP keine Inaktivierung ein.

Die photodynamische Inaktivierung von ADH in RE_{II} ist in den Abb. 9 und 10 dargestellt. Bei allen verwendeten TP-Konzentrationen wird ADH mit steigender Bestrahlungszeit zunehmend inaktiviert (Abb.9). In Abb. 10 wird deutlich, daß ADH mit steigender TP-Konzentration bis zu 110 µM (bei Bestrahlungszeit 5 min.) bzw. 220 µM (bei Bestrahlungszeit 20 min.) in zunehmendem Maße inaktiviert wird, eine weitere Steigerung der Konzentration bewirkt nur noch eine schwache Steigerung der Inaktivierung.

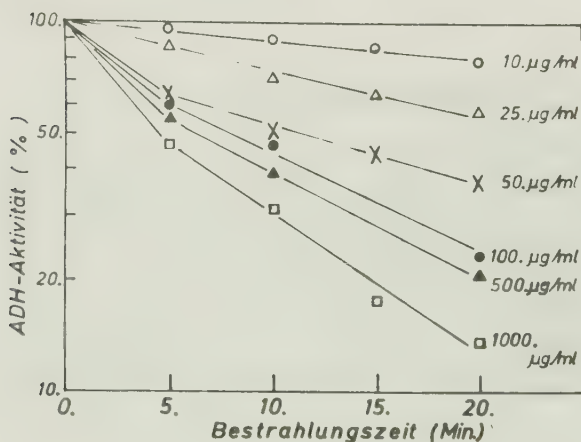


Abb. 9:

Photodynamische Inaktivierung von isolierter ADH in vitro mit TP in Abhängigkeit von Bestrahlungszeit und TP-Konzentration (mit Fraktion RE_{II} bei 0°C).

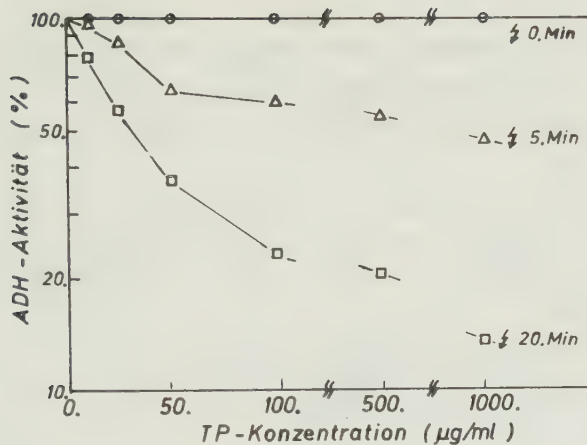


Abb. 10:

Photodynamische Inaktivierung und Dunkelinaktivierung von isolierter ADH in vitro mit TP in Abhängigkeit von TP-Konzentration und Bestrahlungszeit (mit Fraktion RE_{II} bei 0°C)

Wie Tabelle 1 zeigt, wird die ADH-Aktivität in der Lösung von käuflichem ADH-Lyophilisat am stärksten photodynamisch inaktiviert, während offensichtlich die ADH durch andere Zellbestandteile, besonders Membranstrukturen, Ribosomen und Nukleinsäuren, vor photodynamischer Inaktivierung geschützt wird. Tabelle 1 zeigt auch, daß der photodynamische Effekt mit der Steigerung der Temperatur verstärkt wird. Die Temperatur während der Bestrahlung wirkt hier nicht in gleicher Weise wie bei der Zellinaktivierung [Micheler und Lochmann, 1974].

Tabelle 1: Photodynamische Inaktivierung von ADH in vitro
mit TP, bestrahlt im Abstand von 30 cm für 20 min.
100 % = ohne TP und ohne Bestrahlung

	TP-C _e (µg/ml)	Temp. (°C)	ADH-Aktivität (%)
RE _I	50	0	56
	50	20	33
	100	20	18
RE _{II}	50	0	37
	50	20	24
	100	0	23.5
	100	20	9
ADH-Lyo- philisat	50	0	10

2.3 Photodynamische Wirkung und Dunkelwirkung von TP auf ADH in unzerstörten Zellen

Ungerührte und ungeschüttelte, bei 30°C in VM kultivierte, stationäre Zellen, die viel ADH produzieren, wurden mit 0.05 M KH₂PO₄ gewaschen und in Zellkonzentration von 10⁹/ml mit TP in verschiedener Konzentration 20 min. vorinkubiert. Um den photodynamischen Effekt zu testen, wurde die Zellsuspension mit TP bei 20°C unter Rühren mit sichtbarem Licht bestrahlt. Anschließend wurde die ADH-Aktivität vom Homogenat bzw. von der Fraktion RE_I gemessen.

Abb. 11 zeigt, daß die ADH-Aktivität der im Dunkeln mit TP behandelten Zellen nur wenig inaktiviert wird. Abb. 12 zeigt, daß die photodynamische Inaktivierung von ADH in der unzerstörten Zelle viel geringer ist als die Inaktivierung von ADH in vitro.

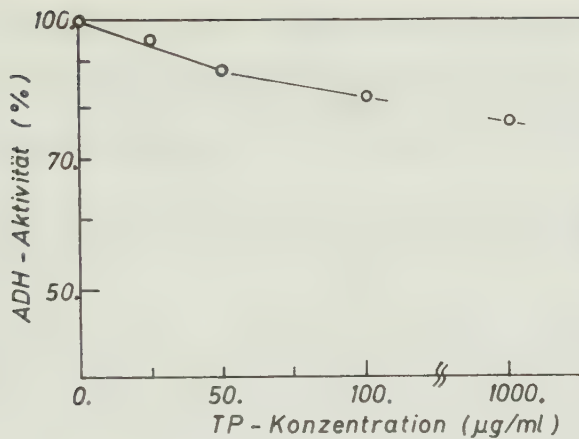


Abb. 11:

Abhängigkeit der Dunkelwirkung von TP auf die ADH in unzerstörten Zellen in Abhängigkeit von der TP-Konzentration (Inkubationszeit 20 min. bei 20°C).

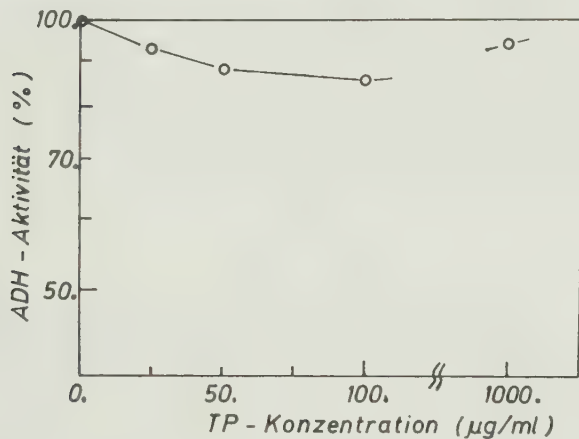


Abb. 12:

Photodynamische Inaktivierung von ADH in unzerstörten Zellen in Abhängigkeit von der TP-Konzentration (Zellkonzentration 10^9 /ml, bestrahlt in TP-Lösung, 100% = Dunkelaktivierungs-Wert)

Der Inaktivierungsgrad von ADH durch TP unter in vitro Bedingungen bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ in Gegenwart und Abwesenheit von Licht ist unabhängig von der ADH-Konzentration im geprüften Bereich (0.05 mg/ml ——— 0.25 mg/ml ADH-Lyophilisat).

Der eigentliche Grund für diese Tatsache kann noch nicht angegeben werden. Jedoch kann man aus Tab. 1 folgendes schließen: Da sich TP an vielen Stellen der Zelle bindet, wird nur ein geringer Teil des Farbstoffs zur Inaktivierung von ADH in vivo zur Verfügung stehen. Deshalb ist auch die Inaktivierungsrate sehr gering. Die ADH wird also vor photodynamischer Wirkung durch andere Zellbestandteile konkurrierend geschützt.

2.4 Bindung von TP an ADH:

Die Bindung von TP an ADH wurde durch spektrophotometrische Untersuchungen im Wellenlängenbereich von 450 bis 600 nm beobachtet. Das Spektrum ändert sich nicht oder nur sehr geringfügig (Abb. 13).

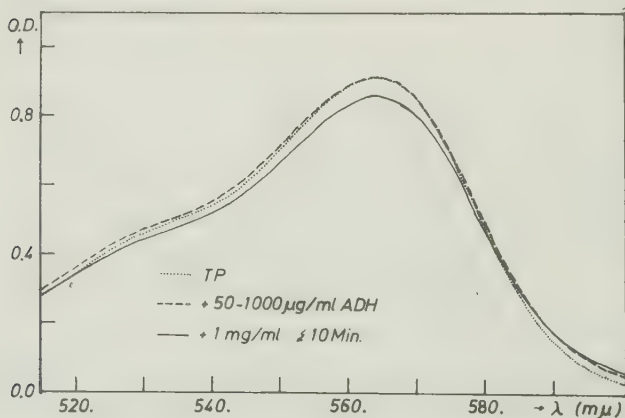


Abb. 13:

Spektrale Absorption von TP im sichtbaren Bereich in Abhängigkeit von der Zugabe verschiedener Mengen ADH.

Nur nach einer Bestrahlung mit sichtbarem Licht wurde eine Abnahme der Absorption bei der maximalen Wellenlänge beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, daß offensichtlich die Bindungsfähigkeit dieses Enzyms an TP gering ist. Damit könnte u. a. eventuell die geringe Wirkung auf die ADH in vivo erklärt werden (vgl. 2.3).

3. TP-Wirkung auf die Atmungsaktivität von Hefezellen

Stationäre Zellen (Stamm 211) wurden mit Kalium-Phosphat-Puffer (0.05 M pH 6.8) 3 mal gewaschen, resuspendiert im Puffer mit einer Zellkonzentration von ca. 4×10^8 /ml und mit 20 bis 200 $\mu\text{g/ml}$ TP-Lösung in 0.05 M KH_2PO_4 (pH 4.5) 1:1 gemischt (pH 6.5). Anschließend wurden die Zellen bei 22°C im Dunkeln bestimmte Zeitabstände inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Puffer gewaschen und gleich oder nach der Bestrahlung mit sichtbarem Licht wurde der Sauerstoffverbrauch von 1 ml Zellsuspension mit Hilfe des Warburg-Apparates (Braun-Melsungen, Typ SL 85) gemessen. Der Sauerstoffverbrauch in 60 min. der im Dunkeln mit TP behandelten Zellen wurde im Verhältnis zu dem Wert ohne Behandlung aufgezeichnet und der Wert nach der Bestrahlung wurde auf die Dunkelwirkung des TP's bezogen.

3.1 Einwirkungszeitabhängigkeit der Dunkelwirkung:

Bei mit TP (Endkonzentration 22 und 220 μM) behandelten Zellen wurde die Atmung bis zu etwa 30 min. Einwirkzeit mit zunehmender Einwirkungszeit zunehmend inaktiviert (Abb. 14). Bei 100 $\mu\text{g/ml}$ (220 μM) wurde die Atmung nur etwas mehr inaktiviert als bei 10 $\mu\text{g/ml}$ (22 μM). Der Unterschied zwischen beiden Konzentrationen wurde aber erst bei höherer Einwirkzeit deutlich. Eine Ausbleichung von TP konnte während der Messung der Atmung mit bloßen Augen beobachtet werden.

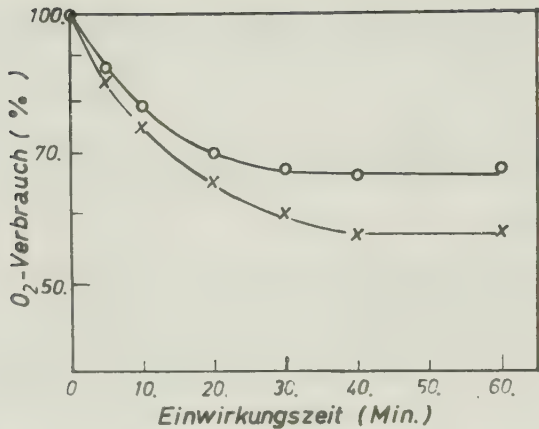


Abb. 14:

Dunkelwirkung von TP auf die Atmungsfähigkeit vitaler Hefezellen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des Farbstoffs bei 2 TP-Konzentrationen (o—o 10 µg/ml, x——x 100 µg/ml).

3.2 Bestrahlungszeitabhängigkeit des photodynamischen Effekts auf die Atmungsfähigkeit von Hefezellen:

Die Atmung wurde mit zunehmender Bestrahlungszeit bis zu 5 min. linear zunehmend inaktiviert, aber schon nach 5 min. bis 10 min. ist ein optimaler Inaktivierungswert erreicht (Abb. 15). Um den photodynamischen Effekt auf die Atmung mit dem auf die Koloniebildung zu vergleichen, benutzt man den t_{37} -Wert (d.h. die Zeit, bei der 37% (1/e) der originalen Zellen oder der Aktivität überleben). Bei einer angenommenen Vorinkubationszeit von 5 min. ist t_{37} für die Atmung 1.6 min., t_{37} für die Koloniebildung 3.3 min. Die Atmung ist also doppelt so empfindlich.

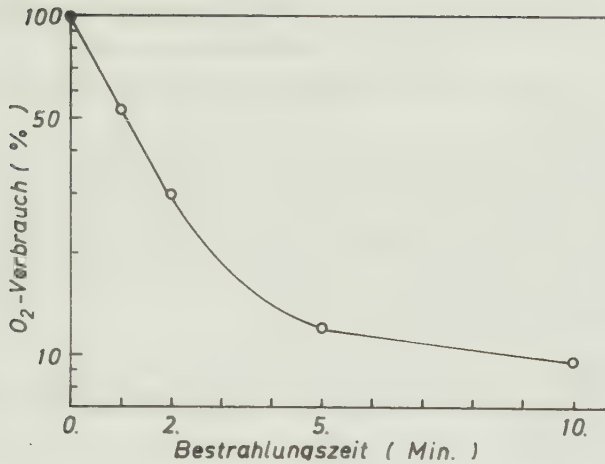


Abb. 15:

Photodynamische Inaktivierung der Atmung vitaler Hefezellen mit TP in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (TP-Konzentration 10 µg/ml, 22 µM).

Nach 5 min. Bestrahlung wurde die Atmungsfähigkeit der gleichen Zellsuspension zu gering, um meßbare Werte zu erhalten. Deswegen wurde schon bei der Behandlung die Zellkonzentration 5 mal erhöht. Dabei wurde die photodynamische Wirkung von TP auf die Atmung viel geringer. Der Wert für Abb. 15 wurde durch einen Versuch erhalten, bei dem 5 mal mehr Zellsuspension in gleicher Konzentration mit TP und Licht behandelt wurde, und nur um die Atmung zu messen wurde die Zellkonzentration bis 5 mal erhöht und der erhaltene Wert durch 5 geteilt.

Jacob hat geschrieben [1974]: Wenn TP von Bakterien reduziert wird, wird die Verminderung der Wirkung durch die Verminderung der TP-Konzentration erreicht. Die Reduktion des TPs (TP→Leuco-TP) ist irreversibel und wird nur bei hoher Zellkonzentration beobachtet. Hier wurden die Versuche bei einer recht hohen Zellkonzentration (über 10^8 /ml) durchgeführt. Während der Behandlung und der Messung

wurde die Ausbleichung von TP mit bloßen Augen recht gut beobachtet. Eine signifikante pH-Änderung wurde nicht festgestellt. Die Inaktivierungssättigung könnte auch durch die Reduktion des TPs erklärt werden.

Es ist schon beschrieben worden, daß das Absorptionsspektrum sehr abhängig von der H^+ -Konzentration ist [Micheler, 1972]. Aber im pH Bereich von 4.5 bis 6.8 in 0.05 M Kalium-Phosphat-Puffer ist die Absorption bei der Maximalwellenlänge 564 nm im sichtbaren Teil gleich geblieben.

3.3 TP-Konzentrationsabhängigkeit der photodynamischen Wirkung auf die Atmung:

Der photodynamische Inaktivierungsgrad steigerte sich mit steigender TP-Konzentration bis 25 $\mu\text{g/ml}$ (55 μM), dann fiel er etwas mit zunehmender TP-Konzentration ab. Der höchste Inaktivierungsgrad bei verschiedenen Bestrahlungszeiten wurde immer etwa bei 25 $\mu\text{g/ml}$ erreicht (Abb. 16). Die Kurven aus Abb. 16 können ähnlich wie die Zellinaktivierungsversuche (von Stamm 2200) erklärt werden (vgl. Abb. 5 und 6).

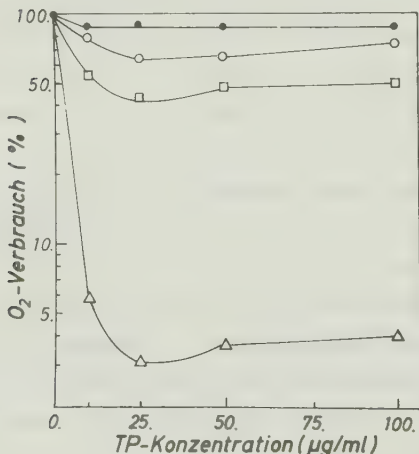


Abb. 16:

Dunkelinaktivierung und photodynamische Inaktivierung der Atmung unzerstörter Hefezellen in Abhängigkeit von der TP-Konzentration (● —● Dunkelwirkung, ○ —○ 0.5 min, □ —□ 1 min, Δ —Δ 10 min Bestrahlungszeit)

TP-Wirkung auf die Gärungs-Aktivität von Hefezellen

Stationäre Zellen (Stamm 211) wurden mit Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6.8) 3 mal gewaschen und resuspendiert im Puffer mit einer Konzentration von ca. 1.5×10^8 /ml, dann wurde 20-200 $\mu\text{g/ml}$ TP-Lösung in 0.05 M KH_2PO_4 (pH 4.5) 1:1 hinzugegeben und im Dunkeln bei 22°C die gewünschte Zeit inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit dem Puffer gewaschen und gleich oder nach der Bestrahlung wie bei den anderen Versuchen abzentrifugiert. Um nur die alkoholische Gärung zu messen wurde der pH-Wert der Zellsuspension unter 5 durch Resuspendierung in 0.05 M KH_2PO_4 gesetzt, anschließend wurde die CO_2 -Produktion der Zellen unter anaerobischen Bedingungen mit Hilfe desselben Warburg-Apparates wie bei der Messung der Atmung gemessen. Die anaerobischen Bedingungen wurden durch Durchspülung des Apparates mit Stickstoffgas erhalten.

4.1 Einwirkungszeitabhängigkeit der Dunkelwirkung auf die anaerobische Gärung

Die anaerobische Gärung wurde im Dunkeln von 5 bis 60 min. Einwirkung bei einer TP-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (22 μM) nur sehr geringfügig inaktiviert. Es wurde nach 60 min. Einwirkzeit ca. 90 % Restaktivität gemessen (Abb. 17).

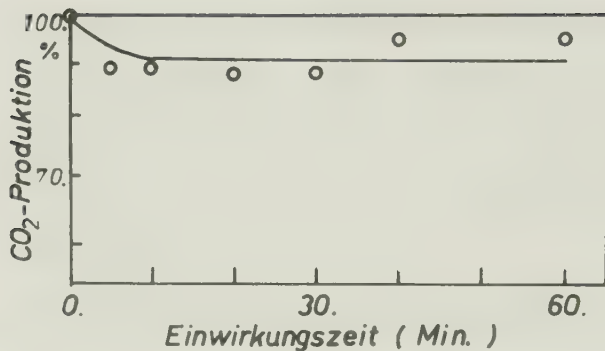


Abb. 17:

Dunkelinaktivierung der anaerobischen Gärung unzerstörter Hefezellen nach TP-Einwirkung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.

4.2 Bestrahlungszeitabhängigkeit der photodynamischen Wirkung auf die anaerobische Gärung

Die anaerobische Gärung wurde mit zunehmender Bestrahlungszeit bis 40 min. zunehmend inaktiviert. Jedoch ist die photodynamische Wirkung auf die Gärung viel schwächer als auf die Atmung (vgl. Abb. 18 und 15). Bei 5minütiger Dunkelvorinkubation war der t_{37} -Wert für die Atmung 1.6 min., für die Gärung 9.4 min.

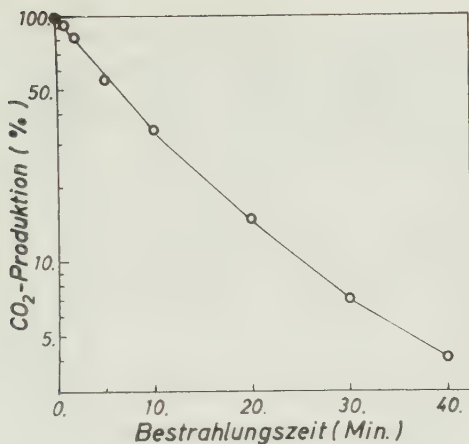


Abb. 18:

Photodynamische Inaktivierung der Gärungsfähigkeit unzerstörter Hefezellen mit TP (10 µg/ml) in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (100 % = Dunkelinaktivierungswert bei gleicher TP-Konzentration).

4.3 Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von TP auf die anaerobische Gärung (Hell- und Dunkelwirkung):

Der photodynamische Inaktivierungsgrad steigerte sich stark mit zunehmender TP-Konzentration bis 25 µg/ml (55 µM) und nahm dann noch bis 100 µg/ml (220 µM) schwächer zu. Der Dunkelinaktivierungsgrad bei 5 min. Einwirkzeit blieb immer gleich von der TP-Konzentration 10 bis 100 µg/ml (Abb. 19). Die Konzentrationsabhängigkeit ist also anders als bei der Wirkung auf die Atmung oder auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen. Eine Erklärung dafür kann zur Zeit noch nicht gegeben werden. Bereits 1964 wurde eine unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit von Atmungs- und Gärungsprozessen beobachtet [Hempel und Laskowski, 1964]. Dabei wurde als Ursache an eine Hemmung der ATP-verbrauchenden Prozesse nach einer Röntgenbestrahlung gedacht. Dabei soll eine Hemmung des ATP-Verbrauchs

sich auf die Atmung stärker als auf die Gärung auswirken, da bei der Gärung nur 2 Mole ATP überschüssig gebildet werden, während im Ablauf der Atmungsprozesse 34 Mole ATP überschüssig freigesetzt werden.

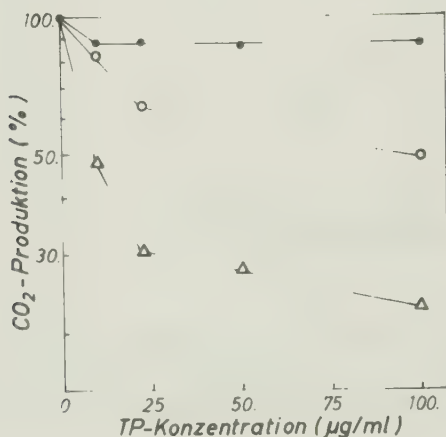


Abb. 19:

Konzentrationsabhängigkeit der photodynamischen und der Dunkelinaktivierung der Gärung unzerstörter Hefezellen mit TP

(● —● Dunkelbehandlung 5 min., o —o Bestrahlungszeit 2 min., Δ —Δ Bestrahlungszeit 5 min.).

5. TP-Wirkung auf die isolierte Mitochondrienfraktion

Die in vivo-Versuche deuten darauf hin, daß die Mitochondrien ein Angriffsort der photodynamischen Schäden in der Zelle sein können. Bei den Versuchen mit dem Enzym ADH wurde gezeigt, daß ein reines Enzym stärker inaktiviert wird als Enzyme in vivo oder in Gegenwart anderer Zellkomponenten (vgl. Tab. 1). Hier wurde ein Versuch zur Wirkung von TP auf die Atmung mit einer isolierten Mitochondrien-

fraktion durchgeführt. Die Mitochondrienfraktion wurde mit Tris- SO_4 -Puffer, pH 7.4, als osmotische Druckbehälter 0.25 M Mannitol oder 0.25 M Sorbitol benutzend, isoliert (siehe Methode). Zur Aktivitätsmessung der Mitochondrien wurde der Sauerstoffverbrauch in bestimmten Zeitabschnitten nach der Zugabe von Succinat, ADP und Hexokinase gemessen. Die direkte Phosphorylierung konnte nicht gemessen werden, da eine Arbeit mit ^{32}P im Institut noch nicht gestattet ist.

Die Kontrollaktivität der Mitochondrien jeder Isolierung war sehr schwankend. Dadurch wurde der Versuch der einzelnen Experimente sehr erschwert. Es wurde jedoch festgestellt, daß eine Dunkelinaktivierung des Sauerstoffverbrauchs der vor der Aktivitätsmessung mit TP behandelten Mitochondrien nicht auftritt. Bei diesen Messungen war jedoch die Kontrollaktivität niedrig. Die Dunkelinaktivierung der Mitochondrien bei der Behandlung des Aktivitätsmessungssystems mit TP ist dagegen sehr stark. Der Unterschied der obigen Dunkelinaktivierung könnte durch einen Unterschied der Bindungsfähigkeit der Mitochondrien zum Farbstoff erklärt werden, da schon bewiesen worden ist, daß die energisierten Mitochondrienpartikel sich an kationische Farbstoffe gut binden können, aber de-energierte Submitochondrienpartikel nur eine geringe Affinität zum kationischen Farbstoff haben [Dell'Antonne, Colonna und Azzone, 1972]. Die photodynamische Behandlung der Mitochondrienfraktion wurde immer vor der Aktivitätsmessung durchgeführt. Die photodynamische Inaktivierung war viel ^{geringer} als unter Berücksichtigung der in vivo-Untersuchungen der Atmung erwarten werden konnte.

Die Atmungskette liegt auf der Innenmembran der Mitochondrien. Die Membranstruktur spielt eine große Rolle für die Atmung. Die isolierte Mitochondrienfraktion hat jedoch teilweise keine intakten Membranen

mehr. Für eine sorgfältige Untersuchung braucht man sehr stabile Mitochondrienfraktionen. Die Untersuchungen sollen später fortgesetzt werden, wenn sehr aktive, intakte Mitochondrien zur Verfügung stehen.

Haga und Spikes [1966] haben auch einige Versuche über den photodynamischen Effekt verschiedener Farbstoffe auf die aus Rattenleber isolierten Mitochondrien durchgeführt. Dabei trat ebenfalls nur eine geringe photodynamische Inaktivierung ein.

Bei den Versuchen über den Effekt ionisierender Strahlen auf die isolierten Mitochondrien wurde gezeigt, daß das Phosphorylierungssystem empfindlicher als das Elektronentransportierungssystem ist [Clarke und Lang, 1965].

Für weitere Versuche wäre es wichtig, die Atmungsaktivität von Mitochondrien verschiedene Zeit nach einer photodynamischen Behandlung zu messen, wobei es sinnvoll wäre, die photodynamische Behandlung der Mitochondrien *in vivo* durchzuführen, um den Eingriff des Effekts in den Stoffwechsel der Mitochondrien unter diesen Bedingungen feststellen zu können.

6. TP-Wirkung auf die Proteinsynthese *in vitro*

Die TP-Wirkung auf die Proteinsynthese bei Hefen *in vivo* und *in vitro* wurde von Lochmann und Pietsch [1967] und von Micheler [1972] geprüft. Es wurde berichtet, daß die Dunkel- und Hellinaktivierung der Proteinsynthese *in vivo* (Aufnahme von radioaktiver Aminosäuren in die Zelle oder in die Proteinfraction) relativ groß, d.h. etwas größer als auf die Koloniebildung ist. Bei *in vitro*-Ver-

suchen im Poly-U-System hat die Dunkelinaktivierung etwa das Ausmaß wie bei Untersuchung der Koloniebildung, aber die photodynamische Inaktivierung ist gering. Wurden einzelne Komponenten gesondert behandelt, wurde bei Behandlung der Ribosomenfraktion fast die gleiche Inaktivierung erreicht wie bei Behandlung des Gesamtsystems. Die Enzymfraktion wurde auch etwas inaktiviert, aber die sonstigen Komponenten wurden kaum beeinträchtigt [Micheler, 1972].

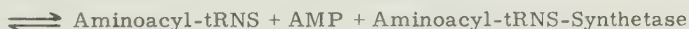
6.1 TP-Wirkung auf die Aminoacylierung der tRNS:

Hier in dieser Arbeit wurde die TP-Wirkung auf eine Teilreaktion der Proteinsynthese, auf die Aminoacylierung, geprüft. Die Aminoacylierung wird mit folgender 2-Stufen-Reaktion beschrieben:

1. Aminosäure + ATP + Aminoacyl-tRNS-Synthetase



2. Aminoacyl-AMP-Enzym + t RNS



Die Reaktion wird von Pyrophosphat und Phosphat u.a. gehemmt [Loftfield, 1971]. Da bei den Versuchen nur TP-Lösung in 0.05 M KH_2PO_4 vorhanden war, wurde von den Versuchen die Hemmung der Aminoacylierung durch KH_2PO_4 getestet (Abb. 20). Zur Kontrollprobe wurde die gleiche Menge KH_2PO_4 wie bei der Testprobe eingegeben. Die Behandlung durch TP und Licht wurde bei 0°C ausgeführt, um eine Schädigung der Komponente, der Reaktion und den Ablauf der Reaktion von der Inkubation zu verhindern. Die relative Aminoacylierungsaktivität wurde aus der Radioaktivität der mit tRNS gebundenen Aminosäure berechnet.

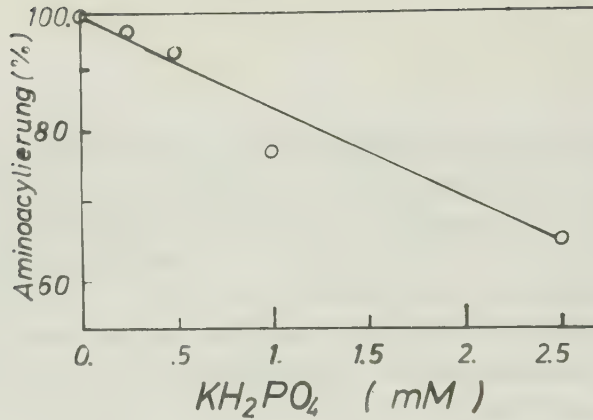


Abb. 20:

Abhängigkeit der Aminoacylierung (Lys) von der Phosphatkonzentration.

6.1.1 Behandlung des gesamten Aminoacylierungssystems (außer D-Phe) mit TP (22 μ M) in Gegenwart und Abwesenheit vom Licht:

Im Dunkeln bis 50 min. Einwirkzeit wurde die Aminoacylierung (Phe) nicht aktiviert. Durch die Bestrahlung wurde sie mit zunehmender Bestrahlungszeit bis zu 30 min. linear steigend gehemmt (Abb. 21).

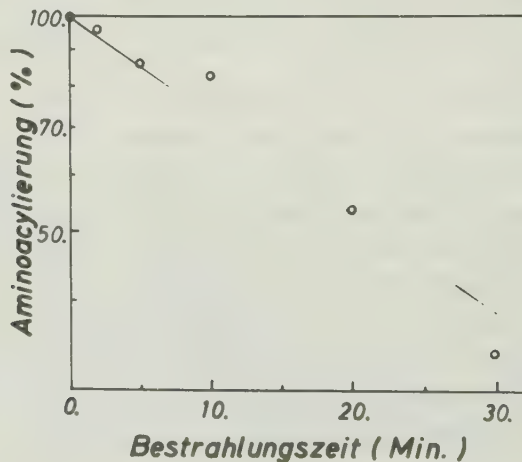


Abb. 21:

Abhängigkeit der TP-Wirkung auf die Aminoacylierung von der Bestrahlungszeit (Behandlung des Gesamtsystems). Vorinkubation 20 min., 0°C. 100% = Dunkelbehandlung 50 min bei 0°C (nicht inaktiviert).

1.2 Behandlung der Enzymfraktion mit TP im Dunkeln und Hellen:

Behandelt wurde nur die Enzymfraktion mit verschiedenen Konzentrationen an TP (22-110 μM). Im Dunkeln wurde die Aminoacylierungsaktivität (für Lys und Phe) nicht inaktiviert (Abb. 22). Durch die Bestrahlung wurde mit zunehmender Bestrahlungszeit bis 30 min. und mit zunehmender Konzentration bis zu 110 μM eine steigende Inaktivierung erreicht (Abb. 22 und 23). Man erkennt eine etwas unterschiedliche Empfindlichkeit gegen den photodynamischen Effekt zwischen Phenylalanin- und Lysin-tRNS-Synthetase.

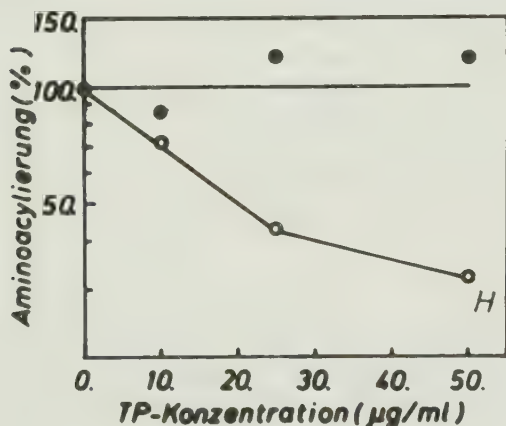


Abb. 22:

Abhängigkeit der Hell- und Dunkelwirkung auf die Aminoacylierung von der TP-Konzentration bei Behandlung des Enzyms (Bestrahlungszeit 30 min.)

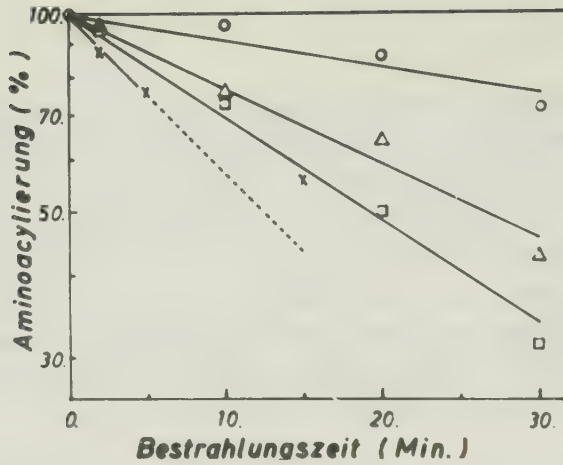


Abb. 23:

Abhängigkeit der Inaktivierung von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen (Phe, Lys) von der Bestrahlungszeit nach der Behandlung der Enzyme mit verschiedenen TP-Konzentrationen.

○ — TP 10 µg/ml (Phe), Δ — TP 25 µg/ml (Phe),
□ — TP 50 µg/ml (Phe), × — TP 10 µg/ml (Lys)

100 % = mit TP ohne Behandlung

Mg⁺⁺-Konzentration bei der Aktivitätsmessung 10 mM.

Kukhanova und Kiselev [1966] untersuchten ebenfalls die photodynamische Inaktivierung verschiedener Aminoacyl-tRNS-Synthetasen aus Rattenleber durch Methylenblau und sichtbares Licht. Sie konnten bei Verwendung von Hefe-tRNS unterschiedliche Empfindlichkeiten bei den verschiedenen Synthetasen feststellen. Die Enzyme zeigten unterschiedliche Empfindlichkeit nicht nur gegen den photodynamischen Effekt, sondern auch gegen SH-Reagenzien. Der Grund könnte in der unterschiedlichen Struktur der Enzyme gesucht werden.

1.3 TP-Bindung an Aminoacyl-tRNS-Synthetase:

Die Bindung von TP an Aminoacyl-tRNS-Synthetase wurde spektralphotometrisch (ähnlich wie mit der ADH) untersucht. Hier wurde ebenfalls keine Absorptionsverschiebung beobachtet, jedoch wurde nach der Änderung des Konzentrationsverhältnisses von TP zur Enzymfraktion eine Veränderung der Absorption festgestellt (Abb. 24).

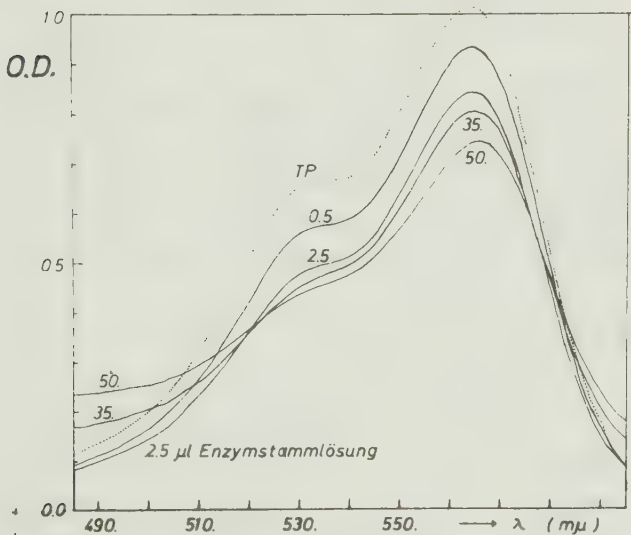


Abb. 24:

Einfluß steigender Mengen Enzymfraktion (Aminoacyl-tRNS-Synthetase) auf das TP-Spektrum in 25 mM Tris-Cl, pH 7.5. Die zugegebene Menge des Enzyms ist an den Kurven angegeben.

6.1.4

Behandlung von tRNS mit TP mit und ohne Licht:

Behandelt wurde nur die tRNS-Lösung mit TP (22 μM) mit und ohne Licht. Es wurde die Aktivität der Aminoacylierung (Phe, Lys) verschiedener Mg^{++} -Konzentration nach photodynamischer Behandlung (Bestrahlungszeit 10 min) gemessen [Tabelle 2]. Es zeigte sich, daß bei einer Konzentration von 10 mM oder unter 15 mM die Aminoacylierungsaktivität durch die photodynamische Behandlung erhöht wurde, daß aber bei einer Mg^{++} -Konzentration

15 mM die Aktivität nicht oder kaum beeinflußt wurde.

Die Aktivität bei einer Mg^{++} -Konzentration von 10 mM nahm durch die Dunkelbehandlung mit steigender TP-Konzentration bis 220 μM bis zu 60% der Kontrolle ab. Durch zusätzliche Bestrahlung nahm die Aktivität im Vergleich zu der im Dunkeln mit gleicher TP-Konzentration behandelter Probe mit zunehmender Bestrahlungszeit bis 30 min. und zunehmender TP-Konzentration bis 220 μM , bis zu 150 % der Dunkelprobe zu (Abb. 25 und 26) und blieb bei ca. 90 % der Kontrolle. Als die Aktivität bei einer Mg^{++} -Konzentration von 30 mM gemessen wurde, wurde nicht nur bei Dunkelbehandlung, sondern auch nach Bestrahlung bis 30 min. (TP-Konzentration bis 220 μM) keine Inaktivierung beobachtet.

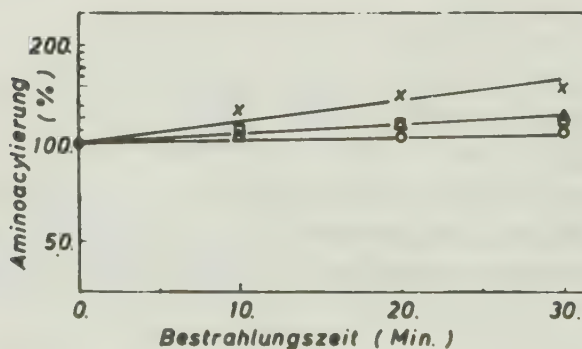


Abb. 25:

Bestrahlungszeitabhängigkeit des photodynamischen Effekts mit TP auf die Aminoacylierung (Phe) bei Behandlung von tRNS.

○ ——— ○ TP 10 $\mu\text{g/ml}$, Δ ——— Δ TP 25 $\mu\text{g/ml}$,
 □ ——— □ TP 50 $\mu\text{g/ml}$, x ——— x TP 100 $\mu\text{g/ml}$,
 100 % = mit TP ohne Bestrahlung.

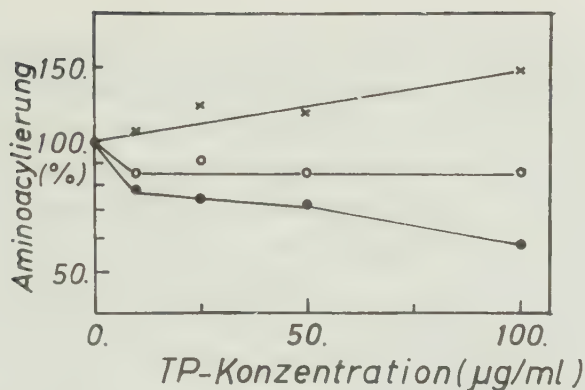


Abb. 26:

TP-Konzentrationsabhängigkeit der Hell- und Dunkelwirkung auf die Aminoacylierung bei Behandlung der tRNS.

- — ● 30 min. Dunkelbehandlung
 - — ○ 30 min. Bestrahlung
 - x — x 30 min. Bestrahlung, 100% = Dunkelbehandlung
- 100% ohne Behandlung

Tabelle 2

Abhängigkeit des photodynamischen Effekts auf die Aminoacylierungsreaktion der tRNS von der Mg^{++} -Konzentration.

Mg^{++} (mM)	Restaktivität der Aminoacylierung (%)		
	TP 25 µg/ml (Phe)	TP 10 µg/ml (Phe)	TP 10 µg/ml (Lys)
5	86	23	110
10	150	248	137
15	98	84	116
20	95	80	92
30	93	89	93
40	91	87	93
50	92	-	87

Diese Ergebnisse würden darauf hindeuten, daß tRNS durch TP-Behandlung bei diesen Konzentrationsverhältnissen (tRNS-MP/TP) mit und ohne Licht nicht geschädigt wird oder aber die erzeugte Modifikation keine Aktivitätsänderung verursacht. Bei der Behandlung von tRNS lagen die tRNS-MP/TP-Verhältnisse zwischen 350 und 3 500. Chandra und Wacker [1966] behandelten tRNS mit TP (22 μ M) und sichtbarem Licht (die Menge von tRNS wurde nicht angegeben). Dabei wurde die Prolin-Akzeptoraktivität der tRNS besonders stark inaktiviert, die Phenylalanin- und Lysin-Akzeptoraktivität der tRNS dagegen nur weniger als 10 %. Daraus könnte geschlossen werden, daß der Anticodonteil der tRNS für die Erkennung spezifischer Aminoacyl-tRNS-Synthetase notwendig ist, denn nur die Guanin-Base wird durch photodynamische Behandlung der Nukleinsäuren mit TP, MB, 4NQO, RF oder Lumichrom zerstört. Das Anticodon auf der tRNS für Prolin enthält 2-3 Guanin-Basen, das Anticodon gegen Phe oder Lys dagegen enthält keine Guanin-Basen. Die Hypothese wurde von Kuwano et al. [1968] etwas unterstützt, jedoch zeigten die Ergebnisse von Kuwano et al., daß die Inaktivierung des Einbaus der Aminosäuren viel stärker ist als die Zerstörung der Guanin-Basen erwarten läßt, und daß auch die tRNS von Phe und Lys durch MB und sichtbares Licht ziemlich stark inaktiviert wird. Bei diesen Versuchen war das tRNS-MP/MB Verhältnis 4-150. Tsugita, Okada und Uehara [1965] haben ebenfalls beobachtet, daß bei der tRNS durch verschiedene Farbstoffe (RF, MB und Lumichrom) und sichtbares Licht die Akzeptoraktivität der Aminosäure beeinträchtigt wird. Sie vermuteten als Ursache des Aktivitätsverlusts der tRNS die Oxidation der Nukleotide. (Bei einem tRNS-MP/Farbstoff-Verhältnis von 295 und 590). Dagegen wird in anderen Arbeiten angenommen, daß der Anticodon-loop für die Erkennung der spezifischen Aminoacyl-tRNS-Synthetase nicht nötig ist [Yoshida, Kaziro und Ukita, 1968; Thiebe und Zachau, 1968; Mirzabekov et al. [1969].

Die Beobachtungen, daß verschiedene Modifikationen der Struktur von tRNS keinen oder nur einen geringfügigen Effekt induzieren, sind sehr zahlreich: Igo-Kemenes und Zachau [1969] haben festgestellt, daß die Spaltung einiger Dihydrouracil-Nucleotide in der tRNS durch Natrium-Borhydrid keinen Einfluß auf die Akzeptoraktivität hat. Bernardi und Cantoni [1969] haben gezeigt, daß die Wegnahme von fünf Nukleotiden vom 5'-Ende der Hefe-tRNS nicht mehr als 20 % Verlust der Akzeptoraktivität bewirkt. Cramer et al. [1969] haben bewiesen, daß behandelte Hefe-tRNS^{Phe}, die nicht mehr intakt an der terminalen Ribose ist, ans Enzym Phenylalanin-tRNS-Synthetase gleich gut wie unbehandelte tRNS^{Phe} gebunden wird. Davidson berichtet, daß die sekundäre Struktur der tRNS offensichtlich nicht für die Anerkennung der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen notwendig ist, da eine Hitzebehandlung, die zur Zerstörung der sekundären Struktur ausreicht, die Akzeptorfähigkeit an die Aminosäuren nicht beeinträchtigt.

1.5

TP-Bindung an tRNS:

Durch spektralphotometrische Untersuchungen ist bekannt, daß TP sich an tRNS bindet, Wie oben gezeigt wurde, hatte die Bindung keinen nennenswerten Einfluß auf die Aktivität der Aminoacylierung. Jedoch sieht es so aus, daß der geringfügig vorhandene Einfluß auf Bindung von der Mg^{++} -Konzentration abhängig ist. Darum wurde hier nochmals die Bindung an tRNS besonders bei verschiedener Mg^{++} -Konzentration spektralphotometrisch untersucht. Das Absorptionsspektrum von TP im sichtbaren Bereich wurde in der Gegenwart von tRNS verschoben. Bei einem tRNS-MB/TP Verhältnis größer als 175, d.h. bei mehr als 2 Mol tRNS zu 1 Mol TP, wurde die Innenbindung gesättigt (Abb. 27).

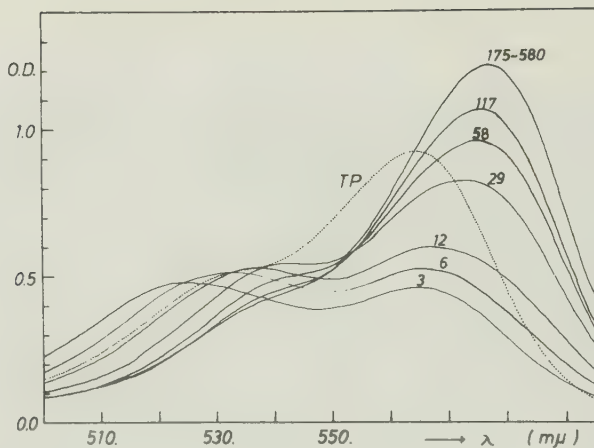


Abb. 27:

Einfluß steigender Mengen tRNS auf das TP-Spektrum in 25 mM Tris-Cl, pH 7.5. Das tRNS-MB/TP Verhältnis ist an den Kurven angegeben.

Die Verschiebung des Spektrums wurde in Gegenwart von Mg^{++} teilweise rückgängig gemacht und mit der Änderung der Mg^{++} -Konzentration ändert sich auch das Absorptionsmaximum (Abb. 28).

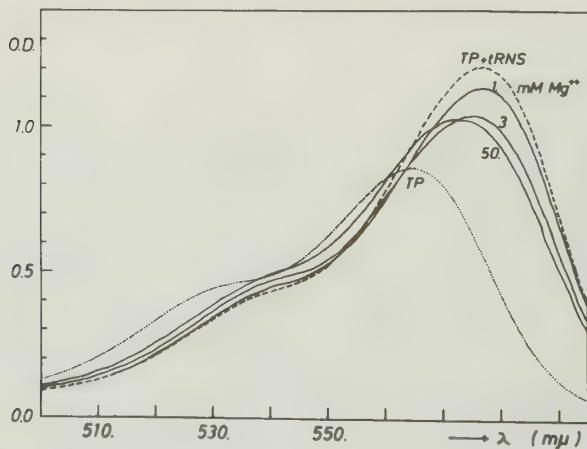


Abb. 28:

Mg^{++} -Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von TP an tRNS in 25 mM Tris-Cl, pH 7.5.

Die Mg^{++} -Konzentration ist an den Kurven angegeben.

Amagasa und Ito [1970], die mit einem anderen Farbstoff gearbeitet haben, haben gezeigt, daß die Aminoacylierungsfähigkeit der tRNS durch Mg^{++} vor einer photodynamischen Inaktivierung geschützt wird. Bei TP könnte auch eine Schädigung der tRNS durch Mg^{++} vermindert werden. Aber zwischen 10 mM und 30 mM wurde kein großer Unterschied beobachtet.

Es ist bemerkenswert in den Versuchen über die TP-Wirkung auf die Aminoacylierung der tRNS, daß der Effekt nach der photodynamischen Behandlung des gesamten Systems größer ist als bei der Behandlung der einzelnen Komponenten. Dies steht im Gegensatz zu den Versuchen mit der ADH.

6.2 TP-Wirkung auf die durch endogenen Messenger gesteuerte Proteinbiosynthese in einem zellfreien System von Hefen (Stamm 211) :

In Kapitel 6.1 wurde die TP-Wirkung auf eine Teilreaktion der Proteinbiosynthese, die Aminoacylierung der tRNS, beschrieben.

Es wurde gezeigt, daß die photodynamische Inaktivierung der Aminoacylierung auf die Beschädigung des Enzyms und nicht der tRNS zurückzuführen ist. Da an der Proteinbiosynthese aber auch Ribosomen, mRNS und Faktoren für Initiation, Elongation und Termination beteiligt sind, war es notwendig, die photodynamische Wirkung des TP auch auf diese Komponenten zu untersuchen. Es wurde für diese Untersuchungen ein Polysomenabhängiges in-vitro-System benutzt, das in der Polysomen-Fraktion mRNS und Ribosomen und in der Enzymfraktion Aminoacylsynthetasen, tRNS und Faktoren enthält.

Bei Behandlung des Gesamtsystems bzw. der einzelnen Komponenten (Polysomenfraktion, Enzymfraktion und energie-lieferndes

System) mit TP (22 μ M) im Dunkeln bei 0°C wurde keine oder nur eine sehr geringe Hemmung des Aminosäureeinbaus verursacht. Wurde das Gesamtsystem mit TP zusätzlich mit sichtbarem Licht bei 0°C bestrahlt, wurde der Aminosäureeinbau mit zunehmender Bestrahlungszeit inhibiert. Eine Inhibition von 80% wurde bei der Bestrahlungszeit von 30 min. erreicht. Bei der photodynamischen Behandlung der einzelnen Komponenten induzierten die Behandlungen der Polysomenfraktion und der Enzymfraktion die Reduktion der Proteinsynthese mit zunehmender Bestrahlungszeit auf ca. 40% (das entspricht etwa der Empfindlichkeit der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen allein). Die Behandlung des Energie-liefernden Systems erbrachte dagegen keine Hemmung der Proteinsynthese (Abb. 29).

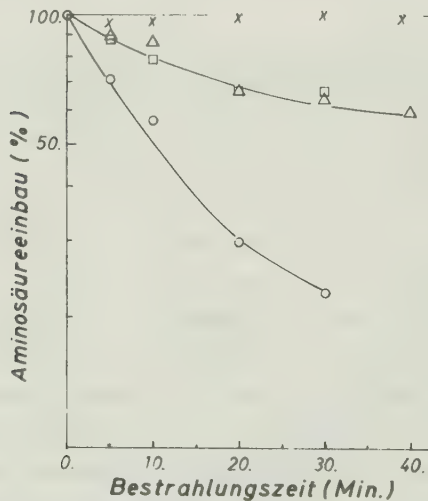


Abb. 29:

Photodynamische Wirkung auf die Proteinsynthese in einem zellfreien Polysomensystem.

o ——— o Behandlung des Gesamtsystems,

Δ ——— Δ Behandlung der Enzymfraktion

□ ——— □ Behandlung der Polysomenfraktion

x ——— x Behandlung des Energie-liefernden Systems

100% = Dunkelbehandlung

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß neben der Aminoacyl-tRNS-Synthetase auch die Polysomen durch den photodynamischen Effekt des TPs in ihrer biologischen Aktivität beeinträchtigt werden.

Wenn die Inaktivierung der Aminoacylierung mit der Proteinsynthese in einem zellfreien Polysomensystem verglichen wird, ist die

t_{50} bei der Behandlung des Aminoacylierungssystems ca. 22 min und die

t_{50} bei der Behandlung des Polysomensystems ca. 12 min.

Es wurde damit gezeigt, daß das Polysomensystem zur Proteinsynthese, das das Aminoacylierungssystem enthält, gegen photodynamischen Effekt empfindlicher ist als nur das Aminoacylierungssystem allein.

7. TP-Wirkung auf die Transkription

Die TP-Wirkung auf die RNS-Synthese in vivo wurde von Lochmann, Micheler und Pietsch geprüft, die berichteten, daß die Dunkelwirkung von TP auf die RNS-Synthese ploidiegradabhängig wie bei der Koloniebildung verläuft, daß aber die photodynamische Inaktivierung keine eindeutige Ploidiegradabhängigkeit zeigt [Lochmann, 1967]. Im Unterschied zur Wirkung von Röntgenstrahlen verläuft die Aufnahme von Uracil-2-¹⁴C, die ein Maß für die RNS-Synthese darstellt, nach der photodynamischen Behandlung, wie das Wachstum der Zellen: es zeigt sich zuerst dosisabhängige Verlängerung der lag-Phase und der höchste Wert der Aufnahme

wird nur wenig verringert [Micheler, Pietsch und Lochmann, 1973].

In dieser Arbeit wurde die TP-Wirkung auf die DNS-abhängige RNS-Synthese in einem zellfreien System in Gegenwart und in Abwesenheit von sichtbarem Licht untersucht.

7.1 Dunkelwirkung auf die RNS-Synthese in vitro:

7.1.1 Behandlung des gesamten Systems:

Wurde das gesamte System zur RNS-Synthese (ohne ^3H -UTP) mit TP im Dunkeln behandelt, wurde die Inkorporation von ^3H -UTP in säurefällbarem Material mit zunehmender TP-Konzentration bis $220\text{ }\mu\text{M}$ stark inaktiviert (Abb. 30).

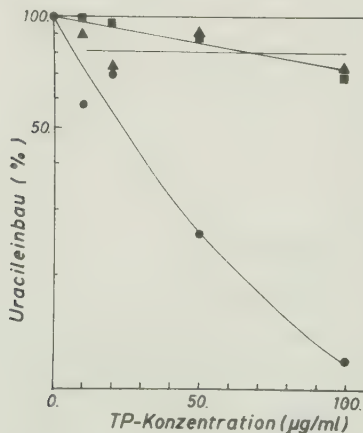


Abb. 30:

Abhängigkeit der Dunkelwirkung auf die DNS-abhängige RNS-Synthese in vitro von der TP-Konzentration

- — ● Behandlung des Gesamtsystems
 - ▲ — ▲ Behandlung des Enzyms (RNS-Polymerase)
 - — ■ Behandlung der denaturierten DNS
- (Einwirkzeit 20 min., 100% = ohne Behandlung)

7.1.2 Behandlung von DNS gesondert:

Wenn DNS gesondert mit TP im Dunkeln behandelt wurde, nahm die Aktivität auch mit steigender TP-Konzentration bis $220\text{ }\mu\text{M}$ ab. Wie schon aus Bindungsversuchen von TP an DNS hervorgeht, stellt sich die Bindung von DNS an TP und die Veränderung der DNS-Konformation sehr schnell ein [Micheler, 1972]. Da sich das endgültige Ausmaß der Inaktivierung bereits sofort nach TP-Zugabe einstellt, ist anzunehmen, daß die Template-Aktivität durch die TP-Bindung beeinträchtigt wird.

7.1.3 Behandlung des Enzyms gesondert:

Im Fall, daß nur die RNS-Polymerase B mit verschiedener TP-Konzentration und verschiedener Einwirkzeit im Dunkeln behandelt wurde, blieb die Aktivität des Systems erhalten (Abb. 30).

7.2 Hellwirkung von TP auf die RNS-Synthese in vitro:

Die Hellwirkung bei der TP-Konzentration von $22\text{ }\mu\text{M}$ wurde auch hier auf die Dunkelwirkung bei gleicher TP-Konzentration bezogen. Die größte Inaktivierung zeigte sich bei Behandlung des Gesamtsystems, während die Einwirkung auf die RNS-Polymerase und die denaturierte DNS ebenfalls noch deutliche Wirkungen erkennen lassen (Abb. 31). Es ist die

t_{50}	bei der Behandlung des Gesamtsystems	ca. 3.5 min.
t_{50}	bei der Behandlung des Enzyms	ca. 19 min.
t_{50}	bei der Behandlung der DNS	ca. 60 min.

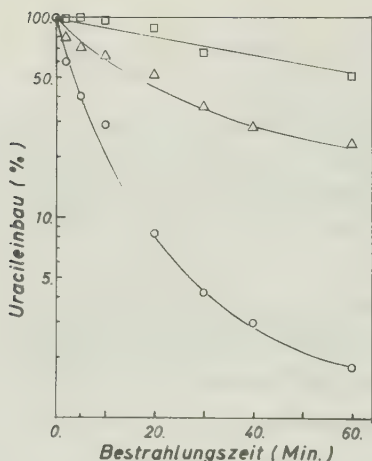


Abb. 31:

Photodynamische Wirkung von TP (22 μ M) auf die DNS-abhängige RNS-Synthese in vitro.

- ——— ○ Behandlung des Gesamtsystems
- △ ——— △ Behandlung der RNS-Polymerase
- ——— □ Behandlung der denaturierten DNS

Die Tendenz, wie oben erwähnt, ist ähnlich wie bei der Protein-synthese in vitro.

TP bindet sich an DNS im Dunkeln leicht. Daher ist bei DNS-Dunkelbehandlung die Hemmung der RNS-Synthese erklärbar.

Aber die Bindung wirkt sich auf die Energieübertragung des Lichtes nicht so stark aus und bewirkt nicht so starke weitere Verminderung der DNS-Template-Aktivität.

TP bindet sich an das Enzym nicht oder nur sehr schwach. Aber trotzdem wird offensichtlich Energie des Lichtes auf das Enzym übertragen und die Enzymaktivität teilweise gehemmt.

Es könnte angenommen werden, daß die Zerstörung des Enzyms unter Hellbedingungen eine größere Rolle für die Hemmung der Inkorporation von ^3H -UTP in RNS als die der Guanin-Basen und/oder die Änderung der Konformation von DNS spielt. Weitere Untersuchungen sind noch im Gange.

IV. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die bisherigen Arbeiten über die photodynamische Wirkung von TP auf Hefezellen lassen vermuten, daß TP bei Hefen im Gegensatz zu Bakterien und Viren photodynamisch keine DNS-Schäden macht. UV- oder ionisierende Strahlen wirken im Gegensatz dazu bei Hefen hauptsächlich über DNS-Schäden. Hinweise, daß Hefen photodynamisch nicht genetisch geschädigt werden, können aus folgenden Punkten gezogen werden:

a.] Es liegt keine Ploidiegradabhängigkeit nach der photodynamischen Inaktivierung von weitgehend homozygoten und isogenen *Saccharomyces*-Stämmen verschiedenen Ploidiegrades vor [Lochmann, Stein und Haefner, 1964].

b.] Es werden keine Mutationen nach der photodynamischen Behandlung bei Hefezellen ausgelöst [Lochmann, Stein und Haefner, 1964; Marquardt und Laer, 1966].

c.] Verschiedene Stoffwechselprozesse der Zelle, z. B. Atmung und Gärung, RNS- und Proteinsynthese sind nach der photodynamischen Behandlung sofort beeinträchtigt [Jannsen, unveröffentlicht; Micheler, Pietsch und Lochmann, 1973; Micheler, 1972], während eine größere Schädigung z. B. nach Röntgenbestrahlung erst nach einiger Zeit eintritt, nämlich dann, wenn der an der DNS gesetzte Schaden sich in der Bildung schadhafter oder falscher Proteine ausgewirkt hat.

d.] Der photodynamische Schaden in der Hefezelle ist irreparabel, d. h. nicht reaktivierbar [Lochmann und Stein, 1968; Ito und Hieda, 1968].

e.] Bisher wurde keine DNS-Schädigung *in vivo* nachgewiesen.

Als Grund dafür könnte angenommen werden, daß TP wahrscheinlich in der Zelle nicht bis an die DNS herandringt, da das TP vorher von anderen Zellkomponenten im Plasma gebunden wird. TP kann erst bei Verwendung sehr hoher TP-Konzentrationen die vielen Hindernisse überwinden, bei Konzentrationen, die für die photodynamische Inaktivierung viel zu hoch sind.

Obwohl DNS-Schäden fehlen, ist das Ausmaß der Inaktivierung von Hefezellen durch den photodynamischen Effekt mit TP sehr stark.

Wenn nun unterschiedliche Inaktivierungsmechanismen bei Pro- und Eukaryonten vorliegen, wäre diese Tatsache wichtig bei der Verwendung des photodynamischen Effekts in der Hauttherapie. Hautkrankheiten erzeugende Bakterien oder Viren könnten durch den photodynamischen Effekt mit TP inaktiviert werden, ohne daß genetische Schäden für die Hautzellen eintreten, ohne daß z.B. eine Tumorauslösung in der Haut zu befürchten ist.

Für die Therapie ist es weiterhin wichtig, Kenntnisse zu haben, welche Stellen in der Zelle besonders photodynamisch geschädigt werden. Für solche Untersuchungen ist die Hautzelle schwierig zu handhaben, statt dessen kann man als ein typisches Eukaryonten-Modell die Hefezelle verwenden.

Verschiedene Ergebnisse in diesem Bereich liegen bereits vor:

So wurde der Transport von Purinen und Pyrimidinen durch die Zellmembran [Micheler und Lochmann, 1973] und die Schädigung von Ribosomen und der Proteinsynthese in vivo und in vitro [Lochmann und Pietsch, 1967; Micheler, 1972] mit TP untersucht. Auch über die Schädigung von Ribosomen aus *E. coli* B [Chandra und Wacker, 1966] und von isolierten Mitochondrien aus Rattenleber [Haga und Spikes, 1966] mit TP ist gearbeitet worden. Mit anderen Farbstoffen wurde über die Bindung von kationischen Farbstoffen an Submitochondrien-

Partikeln aus Rattenleber [Dell'Antone, Colonna und Azzone, 1972], über den Effekt auf die Aminoacylierungsfähigkeit nach der photodynamischen Behandlung von tRNS aus Hefen [Kuwano et al., 1968] und auch über den Effekt auf enzymatische Reaktionen [zusammengefaßt: siehe Spikes und Livingstone, 1969] u.s.w. berichtet.

In dieser Arbeit wurde versucht, genauere Kenntnisse über den photodynamischen Effekt mit TP auf enzymatische Prozesse in der Hefezelle zu erhalten, da es bisher nur sehr wenige Ergebnisse darüber gibt. Es wurden einige wichtige enzymatische Prozesse herausgesucht: Die ADH-Reaktion, die Reaktion der gesamten Mitochondrien sowie Atmung und Gärung der ganzen Zelle als komplexer Prozeß, weiterhin Reaktionen in der RNS- und Proteinsynthese. Der photodynamische Effekt auf diese Reaktionen wurden unter verschiedenen Bedingungen sowohl in vivo als auch in vitro untersucht.

Die Ergebnisse des photodynamischen Effekts auf die ADH-Reaktion zeigten, daß der Effekt auf die Enzymaktivität nach der Behandlung des Enzyms in vitro ohne Gegenwart anderer Komponenten am stärksten ist und die meisten Komponenten der Zelle als konkurrierendes Schutzmittel vor der photodynamischen Wirkung wirken. Deshalb ist auch die Inaktivierung des Enzyms nach der Behandlung in vivo im Vergleich zu der in vitro-Behandlung viel geringer.

Die Mitochondrien funktionieren als Energie-liefernde Systeme für die Lebensvorgänge. Wird die photodynamische Wirkung auf die Funktion der Mitochondrien, die sich mit TP gut binden [Micheler, 1972], d.h. Atmung und Gärung in vivo miteinander verglichen, so erkennt man, daß die Atmung viel stärker inaktiviert wird als die Gärung, jedoch werden beide Funktionen direkt nach der photodynamischen Behandlung beeinträchtigt. Die Ursache des unterschiedlichen Inaktivierungsgrads kann noch nicht genau erklärt werden, aber der-

artige Unterschiede werden auch nach der Röntgenstrahlung beobachtet [Hempel und Laskowski, 1964]. Hier ist zu bemerken, daß die photodynamische Inaktivierung der Gärung *in vivo*, die mit der ADH zusammenhängt, viel stärker ist als die Inaktivierung der ADH *in vivo* und *in vitro*.

Die Atmung *in vivo* wurde bei der Dunkelbehandlung mit niedriger TP-Konzentration ($22\text{ }\mu\text{M}$) ziemlich stark (bis 30% nach 30 min. Einwirkzeit) inaktiviert. Die Dunkelinaktivierung der Atmung ist etwas größer als die der Koloniebildung (20% nach der Einwirkung von 60 min.). Aber bei hoher Konzentration ($220\text{ }\mu\text{M}$) wurde im Gegensatz dazu die Koloniebildung etwas mehr im Dunkeln inaktiviert (vgl. Abb. 4 und 14). Es ist anzunehmen, daß die Inaktivierung der Atmung mit der Bindung von TP an die Mitochondrienmembran oder auch an die DNS der Mitochondrien zusammenhängt.

Der photodynamische Effekt von TP auf jede einzelne enzymatische Reaktion bei Atmung, Proteinsynthese und RNS-Synthese *in vivo* ist fast gleich groß wie der Effekt auf die Koloniebildungsfähigkeit.

Wenn jedes System *in vitro* photodynamisch behandelt wird, wird der Effekt - außer auf die DNS-abhängige RNS-Synthese - viel kleiner, und wird die einzelne Komponente behandelt, wird der Effekt noch viel kleiner als der Effekt bei der Behandlung des Gesamtsystems. Letzteres gilt auch für die DNS-abhängige RNS-Synthese *in vitro*.

Die Inaktivierung bei der photodynamischen Behandlung des Gesamtsystems ist meist größer als die Summe der Inaktivierungen bei der Behandlung der einzelnen Komponenten. Wenn das Gesamtsystem behandelt wird, wird der Effekt auf jedes Molekül kleiner (vgl. ADH), aber die Summierung der Effekte auf die einzelnen Komponenten macht die Hemmung des Gesamtsystems größer. Die Tendenz ist ähnlich wie bei der Proteinsynthese *in vitro* nach der Behandlung jeder Komponente in dem aus *E.coli*-Komponenten aufgebauten System [Chandra, 1970].

Wie oben gezeigt wird, werden mehrere Enzyme und enzymatische Reaktionssysteme durch die photodynamische TP-Behandlung beschädigt, aber meistens in Abwesenheit von Licht durch TP nicht beeinträchtigt. Eine Bindung von TP an Enzym, die die Verschiebung des Absorptionsspektrums von TP verursacht, wurde nicht beobachtet, wodurch die fehlende Dunkelwirkung erklärbar wird.

Durch Bindungsversuche wurde gezeigt, daß TP an Nukleinsäuren sehr gut binden kann. Eine Verschiebung des Absorptionsspektrums von TP durch Zugabe von Nukleinsäuren wurde deutlich festgestellt [Abb. 27 und Micheler, 1972]. Wird die Bindung von TP an Nukleinsäuren in Bezug auf die biologische Aktivität der Nukleinsäuren betrachtet, wirkt sich die Bindung von tRNS an TP offensichtlich nicht auf die Proteinsynthese (weder auf die Aminoacylierung, noch auf die Bindung von tRNS an Ribosomen) aus, da keine Dunkelinaktivierung durch die Behandlung des Gesamtsystems zur Proteinsynthese und zur Aminoacylierung oder der einzelnen Komponenten hervorgerufen wird. Die Inhibition bei der photodynamischen Behandlung der Enzymfraktion vom Polysomensystem, das tRNS enthält, ist fast gleich wie die Inhibition der Aminoacylierung bei der Behandlung der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen-Fraktion. Die biologische Aktivität der tRNS wird sowohl durch die Bindung an TP als auch durch die photodynamische Behandlung offensichtlich nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Bindung von TP an DNS die Template-Aktivität von DNS. Dieses Ergebnis stimmt mit dem bei Bakterien [Chandra und Wacker, 1966] überein.

Die Bindung von TP an Ribosomen wurde schon nachgewiesen [Micheler, 1972]. Aber die Bindung an Polysomen mit einer Konzentration von 22 μM beeinflusst nicht oder nur sehr geringfügig die durch

endogene Messenger gesteuerte Proteinsynthese. Die Polysomenfraktion, die endogene Messenger und Ribosomen enthält, wird aber photodynamisch beschädigt (Abb. 29). Das deckt sich mit bereits vorliegenden Ergebnissen, daß in vitro-Systeme zur Proteinsynthese hauptsächlich durch Schädigung der Ribosomen inaktiviert werden [Micheler, 1972].

Die Rolle, die die Bindung von Ribosomen an mRNA bei der Photosensibilisierung spielt, ist noch nicht klar.

Die DNS-abhängige RNS-Synthese in vitro wird - soweit überhaupt vergleichbar - durch photodynamische Behandlung viel stärker inaktiviert als die Proteinsynthese in vitro und auch mehr als das Koloniebildungsvermögen. Da hier die DNS in einem in vitro-System vorliegt, d.h. TP sich gut an DNS binden kann, scheint der DNS-Schaden - ähnlich wie bei Prokaryonten auch in vivo - eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung zu spielen. In vivo kommt diese Schädigung aus oben bereits diskutierten Gründen nicht in Betracht, da der Farbstoff gar nicht bis zur DNS vordringen kann.

Aus der bisherigen Diskussion folgert nun:

Der photodynamische Effekt auf eine mit einem Enzym zusammenhängende Funktion ist nach der Behandlung des Gesamtsystems für die Funktion größer als nach der Behandlung der einzelnen Bestandteile des Systems. Der Grund dafür ist sicher nicht in der Erleichterung der Energieübertragung des Lichtes zu suchen, sondern es ist anzunehmen, daß die Addition der kleinen Schäden der einzelnen Bestandteile sich so summieren, daß dadurch die Gesamtfunktion stark beeinträchtigt wird. Bei der Betrachtung des Unterschieds zwischen der Wirkung auf Eukaryonten und auf Prokaryonten sollte demnächst auch besonders der Unterschied in der starken Strukturierung der Eukaryontenzelle beachtet werden. Hier sollte auch noch die Wirkung auf verschiedene Membran-Systeme näher untersucht werden. Die im Zusammenhang mit der Membranstruktur interessanten Organellen sind die

Mitochondrien. In dieser Arbeit konnte dieser Punkt leider nicht eindeutig genug geklärt werden, da die isolierten Mitochondrienfraktionen nicht stabil genug waren.

Weiterhin ist es vor der Anwendung des photodynamischen Effekts mit TP in der Therapie von Hautkrankheiten notwendig, noch spezielle Untersuchungen mit zellfreien Hautsystemen und dann auch mit Hautzellen in vivo zu machen. Das Eindringen von TP in verschiedene Hautschichten der Säugetierhaut u. a. auch der Menschenhaut wird bereits parallel zu dieser Arbeit untersucht [siehe Schaefer, 1974 und Kenter, unveröffentlicht]. Weiterhin sind auch die Probleme zu beachten, die sich bei einer Bestrahlung von Zellen in einem Zellverband ergeben.

Auch aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlossen werden, daß sich voraussichtlich der photodynamische Effekt mit TP sehr gut für eine Therapie verschiedener Hautkrankheiten eignen wird. Für eine Therapie wichtig dabei wäre sicher eine Verbesserung der Bestrahlungsquelle, d. h. z. B. eine Entwicklung eines speziellen Lasers, der hohe Lichtintensität etwa im Bereich zwischen 500 und 600 nm abgibt.

LITERATURVERZEICHNIS

- Amagasa, J. und Ito, T. (1970), Radiat.Res. 43, 45
- Bellin, J.S. (1965). Photochem.Photobiol. 4, 33
- Bernardi, A. und Cantoni, G.L. (1969). J.Biol.Chem. 244, 321
- Blum, H.F. (1941) revised ed. (1964). " Photodynamic Action and Diseases caused by Light", Hafner Publ.Comp., New York
- Böhme, H. und Wacker, A. (1963). Biochem.Biophys.Res.Comm. 12, 1.
- Brendel, M. (1968). Molec.Gen.Genetics 101, 111
- Brendel, M. und Kaplan, R.W. (1967). Molec.Gen.Genetics 99, 181
- Büngler, W. (1937). Klin. Wschr. 16, 1012
- Büngler, W. (1937). Z.Krebsforsch. 46, 130
- Calber-Bacq, C.M., Delmelle, M. und Duchesne. J. (1968). Mut. Res. 6, 15
- Chandra, P. (1970). In "Research Progress in Organic, Biological and Medical Chemistry", Vol. 3, pp. 232-257, North-Holland Publ.Comp., Amsterdam, London
- Chandra, P. und Wacker, A. (1966). Z.Naturforschg. 21b, 663
- Clarke, I.D. und Lang, J. (1965). Rad.Res. 24, 142
- Cramer, F., Erdman, V.A., von der Haar, F. und Schlimme, E. (1969). J.Cell Physiol. 74 (Suppl), 163
- Das, J., Baghi, B.und Chaudhuri, U. (1974). Photochem.Photobiol. 19, 31
- Dell'Antone, P., Colonna, R.und Azzone, G.F. (1972). Eur.J.Biochem. 24, 553

- Foote, C.S. (1968). Science 162, 963
- Geißler, E. (1959). Acta biol.med.germ. 3, 96
- Geißler, E. (1967). studia biophysica 2, 95
- Geißler, E. (1970-a). Molec.Gen.Genetics 109, 257
- Geißler, E. (1970-b). Molec.Gen.Genetics 109, 264
- Geißler, E. (1970-c). studia biophysica 19, 163
- Geißler, E. (1970-d). studia biophysica 19, 171
- Gennari, G., Cauzzo, G. und Jori, G. (1974). Photochem.Photobiol. 20, 497
- Haga, J.Y. und Spikes, J.D. (1966). Utah Acad.Proceedings 43, 76
- Hempel, S. und Laskowski, W. (1964). Z.Naturforschg. 19b, 929
- Igo-Kemenes, T. und Zachau, H.G. (1969). Eur.J.Biochem. 10, 549
- Ito, T. und Hieda, K. (1968). Mutation Res. 5, 184
- Jacob, H.-E. (1974). Photochem.Photobiol. 19, 133
- Kaplan, R.W. (1948). Naturwiss. 35, 127
- Kaplan, R.W. (1950). Naturwiss. 37, 308
- Kellmann, A. (1974). Photochem.Photobiol. 20, 103
- Kornhauser, A., Krinsky, N.I., Huang, P.-K.C. und Clagett, D.C. (1973). Photochem.Photobiol. 18, 63
- Kukhanova, M.K. und Kiselev, L.L. (1966). Dokl.Akad.Nauk SSSR 169, 1195
- Kuwano, M., Hayashi, Y., Hayashi, H. und Miura, K. (1968). J.Mol. Biol. 32, 659
- Laskowski, W. (1962). Z.Naturforschg. 17b, 93
- Lochmann, E.-R. (1967). Z.Naturforschg. 22b, 196

- Lochmann, E.-R. und Micheler, A. (1973). In "Physico-chemical properties of Nucleic Acids" (J.Duchesne, ed.), Academic Press, New York, London, Vol. I. 223-267
- Lochmann, E.-R. und Pietsch, I. (1967). *studia biophysica* 2, 431
- Lochmann, E.-R. und Stein, W. (1968). *Biophysik* 4, 243
- Lochmann, E.-R., Stein, W. und Haefner, K. (1964). *Z.Naturforschg.* 19b, 838
- Lochmann, E.-R., Stein, W. und Umlauf, Chr. (1965-a). *Biophysik* 2, 27
- Lochmann, E.-R., Stein, W. und Umlauf, Chr. (1965). *Z.Naturforschg.* 20b, 778
- Loftfield, R.B. (1971). In "Protein Synthesis I" (McConkey, E.H. , ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 1-68
- Lothar, H. (1975). Dissertation, Freie Universität Berlin
- Marquardt, H. und von Laer, U. (1966). *Naturwiss.* 53, 185
- Mattoon, J.R. und Balcavage, W.X. (1967). In "Method in Enzymology" Vol. X. (Estabrook, R.W. und Pullman, M.E., ed.), pp.135-142 Academic Press, New York, London
- Metzner, P. (1924). *Biochem.Z.* 148, 498
- Micheler, A. (1972). Dissertation, Freie Universität Berlin
- Micheler, A. und Lochmann, E.-R. (1971). *studia biophysica* 26, 207
- Micheler, A. und Lochmann, E.-R. (1973). *studia biophysica* 38, 197
- Micheler, A. und Lochmann, E.-R. (1974). *Int.J.Radiat.Biol.* 25, 245
- Micheler, A., Pietsch, I. und Lochmann, E.-R. (1973). *Biophysik* 10, 249
- Micheler, A., Pietsch, I. und Nishiyama-Watanabe, S. (1975), in Vorbereitung

- Mirzabekow, A.D., Kazarinova, L.Ya., Lastity, D. und Bayav, A.A.
(1969). FEBS Letters 3, 268
- Nakai, S. und Saeki, T. (1964). Genet.Res. 5, 158
- Raab, O. (1900). Z.Biol. 39, 524
- Reichert, U. (1969). Dissertation, Freie Universität Berlin
- Ritchie, D.A. (1965). Biochem.Biophys.Res.Comm. 20, 720
- Saito, I., Inoue, K. und Matsuura, T. (1975). Photochem.Photobiol. 21,
27
- Santamaria, L. (1960). in "Recent Contributions to Cancer Research
in Italy", Suppl. to "Tumori", pp. 167-287, Ambrosiana, Milan
- Schaefer, H. (1974). Pressedienst Wiss. der FU Berlin 4, 43
- Schulz-Harder, B. (1975). Dissertation, Freie Universität Berlin
- Spikes, J.D. (1968). In "Photobiology, Vol. III", pp. 33-64
(Giese, A.G., ed.), Academic Press, New York, London
- Spikes, J.D. und Glad, B.W. (1964). Photochem.Photobiol. 3, 471
- Spikes, J.D. und Livingston, R. (1969). In "Advances in Radiation
Biology, Vol. III", pp. 29-121, (Augenstein, L.G. et al., ed.)
Academic Press, New York, London
- Spikes, J.D. und MacKnight, M.L. (1970). In "Photochemistry of
Macromolecules, Proceedings of a Symposium held at the Pacific
Conference on Chemistry and Spectroscopy" (Reinisch, R.F., ed.)
Anaheim. California, Oct. 8-9, 1969. Plenum Press, New York,
London, pp. 67-83
- Tappeiner, H. von und Jodlbauer, A. (1904). Dtsch.Arch.Klin.Med.
80, 427

- Tappeiner, H. von und Jodlbauer, A. (1907). Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung, Vogel, Leipzig
- Thiebe, R. und Zachau, H.G. (1968). Eur.J.Biochem. 5, 546
- Tsugita, A., Okada, Y. und Uehara, K. (1965). Biochim.Biophys. Acta 103, 360
- Van de Vorst, A. und Lion, Y. (1975). Photochem.Photobiol. 21, 85
- Wacker, A., Türck, G. und Gerstenberger, A. (1963). Naturwiss. 50, 377
- Wels, G. (1941). Das Licht, Techn.wiss.Ber., Osram 21, 146-162
- Yoshida, M., Kaziyo, Y. und Ukita, T. (1968). Biochim.Biophys. Acta 166, 646

Lebenslauf

Am 10.9.1941 wurde ich in Tokio geboren. Von April 1948 bis März 1960 war ich Schülerin von Grund-, Mittel- und Oberschulen in Tokio. Von April 1960 bis März 1971 studierte ich an der Universität Tokio Biologie. Im März 1964 erhielt ich den Bachelor of Science (entsprechend dem Vordiplom) und im März 1966 den Master of Science (entsprechend dem Diplom in Biologie). Von November 1968 an konnte ich aus gesundheitlichen Gründen nicht mehr experimentell arbeiten. Im Juli 1971 heiratete ich den Physiker Kusuo Nishiyama. Im Dezember 1971 habe ich mit meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E.-R. Lochmann begonnen. Am 31.3.1972 bekam ich mein erstes und am 31.1.1973 mein zweites Kind. Nach einem 5monatigen Krankenhausaufenthalt mußte ich mich im Dezember 1973 einer Pankreas- und Milzoperation unterziehen. Von März 1974 bis Oktober 1975 habe ich in der Arbeitsgruppe Molekularbiologie des ZI 5 der FU Berlin meine Promotion zu Ende geführt.

